

Aus dem Institut für Anaesthesiologie der
Freien Universität Berlin im Klinikum Charlottenburg
Spandauer Damm 130, 1000 Berlin 19

**UNTERSUCHUNGEN ZUR SAUERSTOFFBINDUNGSKURVE DES
RATTENHÄMOGLOBINS MIT DISKUSSION DER SAUERSTOFFBINDUNG
DURCH DAS SÄUGETIERHÄMOGLOBIN UND DES SAUERSTOFF-
TRANSPORTS IM SÄUGETIERORGANISMUS**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Renate Heß
aus Berlin

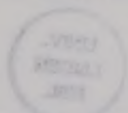
1976

1977

Aus dem Institut für Anaesthesiologie der
Freien Universität Berlin im Klinikum Charlottenburg
Spandauer Damm 130, 1000 Berlin 19

**UNTERSUCHUNGEN ZUR SAUERSTOFFBINDUNGSKURVE DES
ATTENHÄMOGLOBINS MIT DISKUSSION DER SAUERSTOFFBINDUNG
DURCH DAS SÄUGETIERHÄMOGLOBIN UND DES SAUERSTOFF-
TRANSPORTS IM SÄUGETIERORGANISMUS**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Renate Heß
aus Berlin

1976

Referent: Professor Dr. med. J. B. Brückner

Korreferent: Professor Dr. med. F. Körber

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 25.1.77



I N H A L T

	<u>Seite</u>
Einleitung	1
Methode	3
I. Der Dissoziationskurven-Analysator DCA I	3
1. Prinzip der Methode	3
2. Aufbau des DCA I	4
II. Versuchsablauf	10
1. Justierung	10
2. Versuchstiere und Blutgewinnung	11
3. Messung und Aufzeichnung der Kurve	11
4. Analyse der Dissoziationskurve	14
5. Statistik	14
Ergebnisse	16
Diskussion	30
1. Kritik der Meßmethode	30
2. Genauigkeit und Bedeutung der Meßmethode im Vergleich zu anderen Methoden	32
3. Vergleich der eigenen Ergebnisse mit der Literatur	34
4. Sauerstoffbindungseigenschaften des Hämoglo- bins und Sauerstofftransport	35
5. Vergleichende Atemphysiologie der Säugetiere unter besonderer Berücksichtigung der Ratte	52
Zusammenfassung	64
Literaturverzeichnis	65

EINLEITUNG

=====

Die spezifische Fähigkeit des Hämoglobins, molekularen Sauerstoff zu binden, war Gegenstand vieler Untersuchungen seit dem Ende des 19. Jahrhunderts. Es wurden verschiedene Methoden zur Registrierung der Sauerstoffdissoziationskurve entwickelt und die Sauerstoffaffinität von Hämoglobinen verschiedener Spezies unter bestimmten experimentellen Bedingungen wiedergegeben (3, 14, 20, 30, 34, 37, 50, 54, 57, 66, 69, 79, 81).

Eine Reihe von Modellen und Theorien der Sauerstoffbindung durch das Hämoglobin z. B.: 1925 das Adairsche Modell (1), 1936 die Hillsche Theorie (38), 1965 das Monodsche Modell (51), 1965 das Koshland Modell (40), 1970 das Modell von Perutz (63), wurden entwickelt. In letzter Zeit gelang insbesondere durch radiokristallographische Untersuchungen (61) die Aufklärung der molekular-biologischen Struktur des Hämoglobulins. Durch die Entdeckung des Einflusses der organischen Phosphate innerhalb der Erythrozyten auf die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins konnte neuerdings ein Zusammenhang zwischen Erythrozytenstoffwechsel und Hämoglobinfunktion festgestellt werden (18).

Die Sauerstoffbindung durch das Hämoglobin kann summarisch durch die folgende Gleichung wiedergegeben werden:
$$\text{Hb} + 4\text{O}_2 = \text{Hb}(\text{O}_2)_4$$
 4. Wird die Sättigung des Hb, die definiert ist als das Verhältnis der Anzahl der durch Sauerstoff besetzten Bindungsstellen des Hb zu der Anzahl der Gesamtbindungsstellen des Hb, gegen den Sauerstoffpartialdruck aufgetragen, ergibt sich die Sauerstoffbindungskurve des Hämoglobins. Sie zeigt bei den Hämoglobinen der Säugetiere einen S-förmigen Verlauf. Die Lage innerhalb des Koordinatensystems und die Steilheit im Kurvenverlauf, d. h. die Sauerstoffaffinität der Hämoglobine der einzelnen Spezies wie auch der einzelnen Individuen, variieren jedoch erheblich. Die Ursachen der unterschiedlichen Sauerstoffaffinitäten sind vielfältig. So haben die einzelnen Hämoglobine durch Variation der Aminosäuresequenzen eine verschiedene Primärstruktur. Es wurden nur 7 Plätze in den Polypeptidketten der Hämoglobine gefunden, die

bei den verschiedenen Spezies durch dieselben Reste besetzt waren und diese Plätze waren hauptsächlich um die Hämgruppen und an den Kontaktstellen der Untereinheiten des Hb lokalisiert (82).

Innerhalb einer Tierspezies gibt es zudem zahlreiche Varianten in der Primärstruktur des Hämoglobins. Beim Menschen z. B. sind über 100 Mutationen des Hb bekannt, die sich vom normalen Erwachsenen-Hb (HbA) in einigen Aminosäureresten unterscheiden.

Abgesehen von der unterschiedlichen Primärstruktur, die wiederum möglicherweise Änderungen in der Sekundär-, Tertiär- und Quaternärstruktur des Moleküls bedingen kann, sind sicherlich noch viele andere Faktoren für die variierende Sauerstoffaffinität der Säugetierhämoglobine verantwortlich. So wurde in jüngster Zeit gefunden, daß die Hämoglobine verschiedener Säugetiere eine differierende Sensibilität ihrer Sauerstoffbindung auf die organischen Phosphate innerhalb der Erythrozyten zeigten, was durch unterschiedliche Bindungskonstanten des Hb für 2,3-Diphosphoglycerat erklärt wird (75).

Die Albinoratte ist ein häufig benutztes Versuchstier bei Experimenten auf physiologischem, pathophysiologischem, anästhesiologischem und pharmakologischem Gebiet. Für Messungen der Atmungs- und Kreislauffunktion ist die Kenntnis der Sauerstoffbindungskurve des Blutes oft erforderlich. Bartels betont, daß die Betrachtung prinzipieller Vorgänge beim Gasaustausch in der Lunge und im Gewebe z. B. mit Hilfe des O_2 - CO_2 -Diagramms (Rahn-Fenn) ohne die entsprechende O_2 -Dissoziationskurve nicht möglich ist (9). Zur Sauerstoffbindungskurve der Ratte liegen zwar schon mehrere Messungen mit verschiedenen Techniken vor (10, 13, 31, 35, 65, 70, 76, 78). Die Ergebnisse beruhen jedoch meist auf Messungen des Blutes weniger Versuchstiere. Außerdem liegen den in der Literatur beschriebenen O_2 -Dissoziationskurven des Ratten-Hb's nur einige Punkte der Sauerstoffbindungskurve zugrunde. Mit der von Duvelleroy und Laver entwickelten Dissoziationskurven-Analysator-Methode ist es dagegen möglich, die O_2 -Bindungskurve des Hämoglobins über den gesamten Bereich kontinuierlich zu messen (30). In dieser Arbeit soll über Untersuchungen berichtet werden, die es ermöglichen, eine Durchschnitts- O_2 -Bindungskurve des Albinoratten-Hb's mit der Dissoziationskurven-Analysator-Methode aufzustellen.

METHODE

=====

I. Der Dissoziationskurven-Analysator DCA I

Zur Darstellung der Sauerstoffbindungskurven wurde der Dissoziationskurven-Analysator DCA I der Firma Radiometer Kopenhagen benutzt. Das Gerät stellt eine Weiterentwicklung der von Laver und Duvelleroy 1968 angegebenen Methode (30) dar.

1. Prinzip der Methode

Im Gegensatz zu den gasometrischen und photometrischen Methoden sowie der Mischungstechnik wird mit dem Dissoziationskurven-Analysator DCA I mit nur 10 ml Blut die gesamte Dissoziationskurve des Blutes in einem Arbeitsgang kontinuierlich aufgezeichnet. Das Funktionsprinzip des Analysators ist die Wiedergabe der Sauerstofflöslichkeit einer Flüssigkeitsprobe als Funktion des Sauerstoffpartialdruckes in der Lösung. Bedingung für die Versuchsanordnung ist die freie Diffusion von Sauerstoff aus einem bekannten Volumen reinen Sauerstoffs in ein bekanntes Volumen sauerstofffreien Blutes innerhalb eines geschlossenen Systems. Gas- und Flüssigkeits- bzw. Blutphase sind zunächst getrennt. Mit der Kommunikation der beiden Phasen beginnt der Meßvorgang, bei dem die Änderung im Gasphasensauerstoffdruck gegen den Sauerstoffdruck in der Blutphase aufgezeichnet wird durch simultane Messung mit zwei Sauerstoffelektroden in der Gas- und Flüssigkeitsphase. Die Änderung des Gasphasensauerstoffdruckes ist unter o.g. Bedingungen der Änderung des Sauerstoffgehaltes in der Blutphase umgekehrt proportional. Wenn das Gasvolumen (V_g) und das Blutvolumen (V_b) bekannt sind, kann unter Zuhilfenahme der Sauerstoffdruckänderung in der Gasphase (ΔPO_2) der Sauerstoffgehalt des Blutes zu jedem Äquilibrationsspunkt, der durch ΔPO_2 in der Gasphase charakterisiert ist, nach folgender Formel bestimmt werden: Sauerstoffgehalt des Blutes (ml/l) = - $\frac{V_g}{V_b} \cdot \frac{\Delta PO_2}{760} \cdot 10$

Mit der sich darstellenden Kurve, die in der Ordinate die Ab-

nahme des PO_2 in der Gasphase, in der Abzisse die Zunahme des Sauerstoffpartialdruckes im Blut anzeigt, läßt sich also zu jedem O_2 -Partialdruck des Blutes der entsprechende Sauerstoffgehalt bestimmen, es resultiert eine Sauerstoffdruck-Sauerstoffkonzentrationskurve. Durch graphische Festlegung des Endpunktes der Gasdiffusion, d. h. bei annähernd 100 %-Sättigung des Blutes, auf der Abzisse, läßt sich eine Sättigungsprozent- O_2 -Partialdruckkurve aufstellen.

Wegen der Abhängigkeit der O_2 -Bindung des Hb's von der Wasserstoffionenkonzentration ist es weiterhin erforderlich, den pH-Wert der Blutprobe kontinuierlich darzustellen. Bei Verwendung einer Thermostatemperatur von $37^\circ C$ und unter Zuhilfenahme der pH-Kurven können so Dissoziationskurven unter Standardbedingungen erhalten werden.

2. Aufbau des DCA I Radiometer Kopenhagen

Der DCA I setzt sich aus einer elektromechanischen Einheit mit PO_2 - und pH-Verstärker, einer Thermostateinheit sowie Anzeigegeräten und einem X-Y-Schreiber zusammen (Abb. 1).

Die elektromechanische Einheit besteht aus einem Motor für die Pumpe der Thermostatumwälzanlage und für die Pumpe der Absaugung für das Blut aus der Blutkammer; weiterhin gehört zur elektromechanischen Einrichtung eine Temperaturkontrolle für die Thermostatwassertemperatur und ein Motor für das magnetische Rührsystem in der Blutkammer. Die Genauigkeit der Temperaturregelung liegt bei $\pm 0,02^\circ C$. Der Motor für den magnetischen Rührer ist unter dem Thermostatbad unterhalb der Blutkammer lokalisiert; seine Drehgeschwindigkeit wird elektronisch stabilisiert und durch ein Potentiometer im Bereich von 330 bis 3000 U/min kontrolliert. Das Thermostatbad besteht aus einem Stahlreservoir von 12 Liter Volumen; auf seiner Rückseite sind unterhalb der elektromechanischen Einheit die temperaturempfindlichen Elemente der Temperaturkontrolle, die Heizelemente und die Kühlschlange sowie die Umwälzpumpe angebracht, an seiner Vorderseite befinden sich die Elektrodeneinheit und die Gasbe-

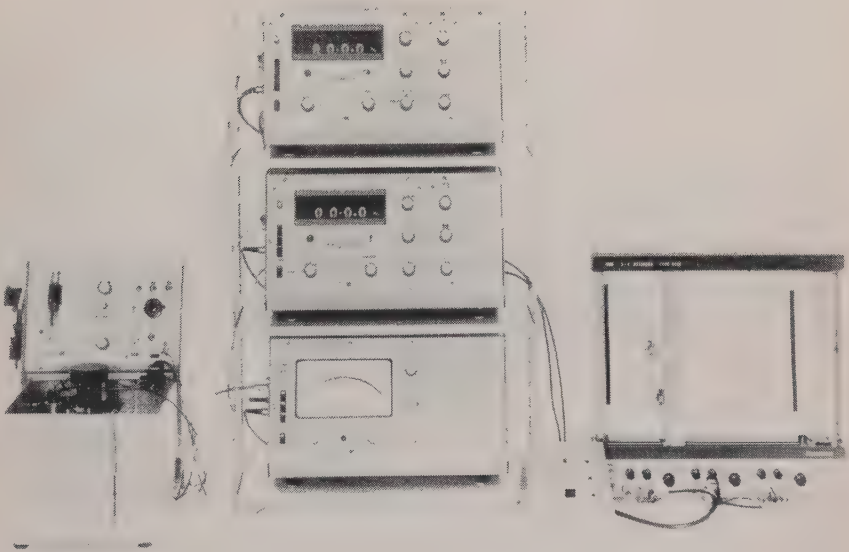


Abb. 1: Frontansicht des Dissoziationskurven-
Analysators DCA I der Firma Radiometer
Kopenhagen einschließlich der Meß- und
Registriereinheit

feuchter für die Äquilibrationsgase.

Die Elektrodeneinheit ist an drei getrennte Meßkanäle angeschlossen, 2 für die PO_2 -Elektroden, 1 für die pH-Elektrode. Die Elektrodenimpulse werden elektronisch verstärkt und können auf einem X-Y-Schreiber registriert werden (Abb. 2). Es bestehen eine obere und eine untere Elektrodeneinheit, die übereinander gelagert sind und auf einer gemeinsamen zentralen Achse montiert sind. Die obere Elektrodeneinheit kann um 180° gedreht werden. Oberer und unterer Elektrodenblock haben je zwei Kammern, die symmetrisch um die Zentralachse angeordnet sind; durch eine Halbdrehung der oberen Einheit kann die Verbindung der Kammern des oberen und unteren Elektrodenblocks entsprechend den Arbeitsbedingungen "initiale Äquilibration" und "Messung" verändert werden. Die beiden Kammern des unteren Elektrodenblocks sind die Probenkammer und die Überschußkammer. Die Probenkammer (6,6 ml Vol.) besitzt drei Fächer zum Einbau der Elektroden: der PO_2 -Elektrode, der Calomel- und der Glaselektrode; die Elektrodenkabel sind zum Schutz unter Wasser von wasserdichten Hüllen umgeben. Außerdem befindet sich ein kleiner magnetischer Rührstab in der Kammer. Die Überschußkammer des unteren Elektrodenblocks hat zwei kleine Fächer; das obere dient als Gaseinlaß, das untere ist ein Einlaß für überschüssige Flüssigkeit. In die der Gasphasenkammer der oberen Elektrodeneinheit gegenüberliegende Kammer wird ein Plastikabdeckzylinder, der sog. Äquilibrationskopf, eingesetzt; dieser hat seitlich eine kleine Öffnung zum Einlaß von wasserdampfgesättigtem Argon-4 % CO_2 -Gemisch, das über eine größere zentrale Öffnung des Abdeckzylinders in die Blutkammer geleitet wird. Die nach oben in Form einer schmalen Metallröhre verlängerte zentrale Öffnung dient auch zum Abfluß des Argon- CO_2 -Gemisches nach außen sowie zur Einbringung der Blutprobe in die Blutkammer.

Eine Gaszelle mit einer Sauerstoffelektrode bildet die Gasphasenkammer auf der anderen Seite; eine Röhre seitlich der Elektrodenhülle der Gaskammer bildet einen Einlaß für das inerte Gas, das zur Kompensation des Gasvolumens, das bei dem Meßvorgang an Sauerstoff von der Gasphase in die Blutphase übergeht, dient. Das Argon- CO_2 -Gemisch, das auch zur Desoxygenation der Blutprobe benutzt wird, wird hier über ein feines Nadelventil in der sog. Argonnadel der Gasphasenkammer entsprechend einer Volumenkon-

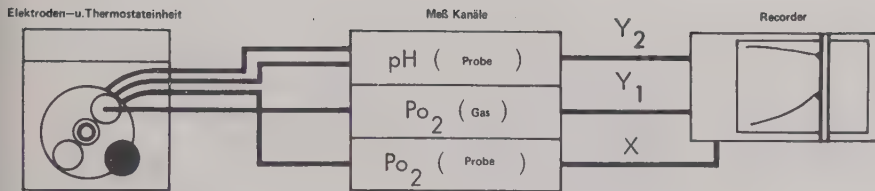


Abb. 2: Schematische Darstellung der Verbindung von Elektroden-, Meß- und Registriereinheit des DCA I

stanz dosiert zugeführt. Die Gasphasenkammer wird über die Gaszuleitungen mit einem wasserdampfgesättigten Sauerstoff-Kohlendioxidgemisch gefüllt (96 % O₂, 4 % CO₂), das wiederum über den Auslaß der Überschußkammer des unteren Elektrodenblocks abfließen kann.

Abb. 3 zeigt das Gasverteilungssystem des DCA I. Die Gase werden aus den Reservoirs zu den Gasbefeuchtern zur Wasserdampf-sättigung geleitet. Die wasserdampfgesättigten Gase fließen dann über die Gaseinlässe der Überschußkammer und des Äquilibrationskopfes in die betreffende Kammer. Der Gastyp, der zu jedem Gaseinlaß der Elektrodeneinheit geleitet wird, kann durch Betätigung eines Gasselektors geändert werden. Die Positionen des Gasselektors sind "Calibration" (Justierungsphase) und "Operation" (Äquilibrations- und Meßphase). Eine kleine Argonleitung umgeht die Gasbefeuchter und wird direkt zu der Argonnadel der Gaskammer geleitet. Über einen auf den Auslaß der Überschußkammer aufgesetzten Gummischlauch, der sich in einer Stahlführungsröhre befindet, geschieht die Beseitigung von überschüssigem Blut aus der Überschußkammer sowie der Abfluß der Gase nach außen.

Als Sauerstoffelektroden werden Clarkelektroden mit einer 0,25 mm Kathode (Gasphase-Typ: E 5042/O, Flüssigkeitsphasen-Typ: E 5043/O) verwendet. Die Antwortzeit der Elektroden ist kleiner als 15 sec und die Empfindlichkeit ca. $3 \cdot 10^{-10}$ A/mmHg. Die pH-Meßkette (Glaselektrode-Typ G 267 C, Calomelektrode-Typ K 413) hat einen Widerstand von weniger als 300 Megaohm und eine pH-Sensibilität über 59 mV je p^H Einheit bei 37°C; die Antwortzeit ist geringer als 15 sec.

Das Anzeige- und Registriersystem besteht aus zwei pH-Metern mit PO₂-Modulation (Typ PHM 71 + PHA 930), einem pH-Meter (Typ PHM 71) und einem X-Y1-Y2-Recorder (Yokogawa Electric Works). Die Sensibilität der X-Skala des Recorders geht bis 120 oder 600 mmHg, je nach Wahl; die der Y1-Skala bis 150-200 mmHg bei Nullpunktunterdrückung bis 700 mmHg. Die Y2-Skala hat eine Empfindlichkeit von 0,02 Δ pH pro cm; bei Nullpunktunterdrückung kann das pH von 6,8 bis 7,6 wiedergegeben werden.

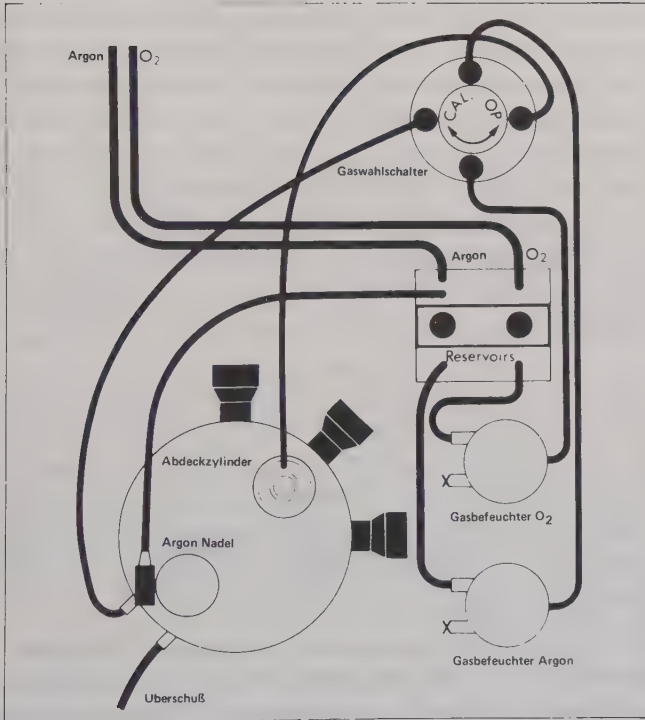


Abb. 3: Schema des Gaszuleitungssystems des DCA I

II. Versuchsablauf

1. Justierung

Bei der Papierkalibrierung des X-Y-Recorders mit dem Registriersystem PHM 71 wurden der X-Kanal (PO_2 -Blutphase), der Y1-Kanal (PO_2 -Gasphase) und der Y2-Kanal (pH-Blutphase) justiert. Die Justierung der PO_2 -Meßkanalschreibung erfolgte mit offenem Eingang des PHM 71 (Nulleinstellung) und mit speziellen Simulatorelektroden, die der pH-Kanalschreibung mit einer pH-Simulatorelektrode Elektrodenkalibrierung. Die Kalibration der pH -Elektrode erfolgte durch Einstellung der pH-Werte von zwei Präzisionspuffern (pH = 7,383, pH = 6,841) auf dem pH-Meter PHM 71, nachdem je 5 ml des betreffenden Puffers nacheinander in die Probenkammer eingebracht worden waren und unter einer Rührgeschwindigkeit von 1500 U/min mindestens 1 min mit der pH-Elektrode in Kontakt waren.

Kalibration der PO_2 -Blutphasenelektrode: der PO_2 -Elektrodenstecker wurde aus der Buchse genommen und die Skala des PHM auf Null eingestellt. Der zweite Justierungsschritt erfolgte nach Äquilibration des Eichpuffers in der Probenkammer mit der Zimmerluft (ca. 3-5 min), indem der bei dem aktuellen Barometerdruck ausgerechnete PO_2 der Luft ($\frac{\text{Barometerdr.}/\text{mmHg} - 47 \text{ mmHg}}{100} \cdot 20,93 \text{ Vol\%}$) auf dem PHM eingestellt wurde.

Die Kalibration des O_2 -freien Wertes der PO_2 -Gasphasen-Elektrode wurde durch manuelles Eintauchen der Elektrode in eine sauerstofffreie Lösung (gesättigte Natriumdisulfitlösung) und Nulleinstellung auf der Skala des PHM vorgenommen. Der zweite Justierungsschritt erfolgte nach stattgehabter Äquilibration des Blutes, wenn sich die Gasphasenkammer bei Stellung "OP" des Gasselektors während der Reduzierphase des Blutes mit dem sauerstoffreichen Gemisch ($\text{O}_2 = 96 \text{ Vol\%}$, $\text{CO}_2 = 4 \text{ Vol\%}$) äquilibriert hatte, indem das PHM auf den errechneten PO_2 -Wert ($\frac{\text{Barometerdr.}/\text{mmHg} - 47 \text{ mm Hg}}{100} \cdot 96 \text{ Vol\%}$) eingestellt wurde.

2. Versuchstiere und Blutgewinnung

Als Versuchstiere dienten 44 männliche Albinoratten. Hiervon waren 30 Ratten normale Wistarratten, die mit Altromintrockenfutter und Wasser ernährt wurden, und 14 SPF-Albino-Wistarratten, die unter "specific pathogen free"-Kautelen aufgezüchtet worden waren. Das Körpergewicht der Ratten lag zwischen 520 und 275 g mit einem Durchschnittsgewicht von 372 g. Die Hämoglobinkonzentration des Blutes der einzelnen Ratten schwankte zwischen 1,9 und 1,1 g/l, bei einem durchschnittlichen Hb-Wert von 1,39 g/l. Die Hämatokritwerte lagen zwischen 0,52 und 0,35 bei einem Durchschnittswert von 0,418.

Da eine Inhalationsnarkose mit Halothan wegen des beschriebenen Einflusses von Halothan auf die Elektroden vom Clark Typ infolge polarographischer Reduktion nicht angewendet werden konnte (71), wurde eine Anästhesie der Ratten mit Pentobarbital (Nembutal R) durchgeführt (50-100 mg/kgKG i.p. oder 200-300 mg/kgKG i.m.). Kurz nach Erreichen eines Schlafstadiums wurde das Abdomen des Versuchstieres eröffnet, die Vena cava inferior freigelegt und punktiert. Das Blut wurde in eine heparinisierte Spritze aspiriert. Die Dauer der Narkose bis zum Eintritt des Schlafstadiums betrug je nach Applikationsart des Pentobarbitals (s.o.) 1-15 min. Die Blutentnahme dauerte ca. 3-5 min. Die notwendige Mindestblutmenge betrug 8,5 ml, wovon 7,5 ml für die Bestimmung der O_2 -Dissoziationskurve und der Rest für die Hämoglobin- und Hkt-Bestimmung verwendet wurden. Das Blut wurde sofort in die Probenkammer des vorher geeichten Dissoziationskurvenanalysators eingebracht. So betrug der Zeitraum vom Beginn der Narkotisierung der Ratten bis zum Beginn der Äquilibration des Blutes im Gerät maximal 20 min.

3. Messung und Aufzeichnung der Dissoziationskurve

Nach Beendigung der Kalibrierungsvorgänge wurde der Gaswählschalter von "Calibration" (Leitung von Argon in die Gas- und Überschußkammer, keine Gaszuleitung in die Probenkammer) auf "Operation"

gestellt; das Gasgemisch von 96 % Argon und 4 % CO_2 floß in die Probenkammer; diese wurde mit Aqua dest. und anschließend mit physiologischer NaCl-Lösung gespült und darauf trockengesaugt. Nach Aufsetzen des Abdeckzylinders auf die Meßkammer wurde, wenn der in der Probenkammer sinkende PO_2 ca. 20 mmHg laut PHM-Anzeige erreicht hatte, das in der Spritze befindliche heparinisierte Blut durch die Metallröhre des Abdeckzylinders mit einer langen Nadel langsam in die Probenkammer gespritzt und die Rührung auf 1500 U/min eingestellt.

Hiermit begann die Reduzierphase des Blutes, die durchschnittlich 1 Stunde in Anspruch nahm und beendet war, wenn die PO_2 -Blutphasenskala des PHM einen PO_2 von Null anzeigte, was bei exakter Kalibrierung einer völligen Desoxygenierung des Blutes gleichkam (Abb. 4 oben). Nach abgeschlossener Reduzierphase sollten die Blut- und Gasphase unter gleichzeitiger Schreibung der Dissoziationskurve kommunizieren. Dazu wurde die Rührung abgeschaltet und der obere Elektrodenblock um 180° bis zum Anschlag gedreht. Dann wurde sofort die Rührung wieder mit 1500 U/min angeschaltet und anschließend die Schreibfedern des X-Y-Recorders zur Registrierung aufgesetzt. Die Sauerstoffdiffusion ins Blut und die O_2 -Bindung durch das Hämoglobin begannen und wurden aufgezeichnet unter gleichzeitiger Wiedergabe der pH-Änderung in der Blutphase bei diesem Vorgang (Abb. 4 unten). Wenn die X-Schreibung am Ende des ersten Wiedergabebereiches bei 120 mmHg angelangt war, wurden die Schreibfedern kurzfristig vom Papier gehoben und nach Umschaltung am Recorder wurde mit 1/5 der Empfindlichkeitsstufe weitergeschrieben. Sobald sich die Schreibgeschwindigkeit zunehmend verlangsamte, wenn nämlich die Differenz zwischen dem PO_2 (Y) und dem PO_2 (X) geringer als 100 mmHg wurde, wurde die Schreibung gestoppt. Die Rührung wurde ausgeschaltet und der obere Elektrodenblock um 180° zurückgedreht. Der sich nun wieder über der Blutkammer befindende Abdeckzylinder wurde abgezogen und das Blut mit dem Sauger abgesaugt. Darauf wurde die Probenkammer einige Male mit einer Reinigungslösung gereinigt und anschließend mit physiologischer NaCl-Lösung gespült. Die Apparatur war nun wieder gebrauchsfertig für eine neue Äquilibration und Analyse einer Blutprobe.

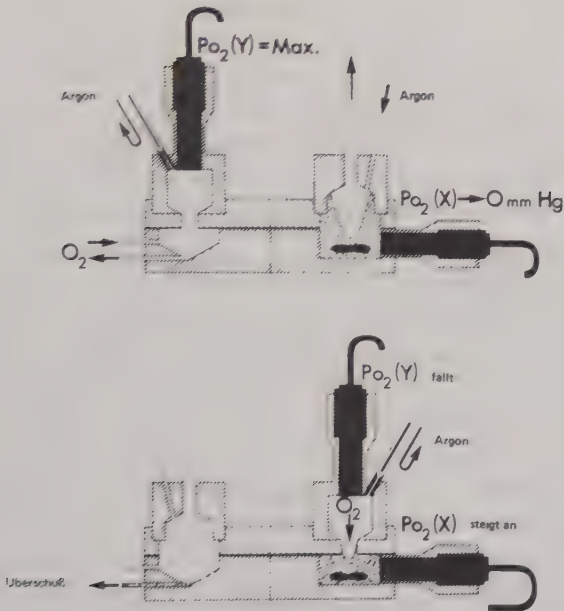


Abb. 4: Gaszuleitungsverhältnisse zum Elektrodenblock sowie Positionsänderungen der Elektrodenkammern zueinander und Gaskonzentrationsbewegungen in den beiden Funktionsphasen der Elektrodeninheit.

Abb. 4 oben: Reduzierphase

Abb. 4 unten: Meßphase

4. Analyse der Dissoziationskurve

Abb. 5 zeigt schematisiert die graphische Auswertung der Kurve mit der Ermittlung des P50-Wertes (PO_2 bei Halbsättigung). Zur Analyse der Kurve wurde der obere Teil der Kurve (B), der durch Empfindlichkeitsreduktion in der X-Registrierung erhalten wurde, auf den unteren (A) extrapoliert. Hierzu wurde an den oberen Kurvenschenkel die Tangente angelegt, deren Steigung Ausdruck der Sauerstofflöslichkeit im ganzen Blut ist, und der Schnittpunkt der Tangente mit der Ordinate (C) wurde markiert; der Ordinatenwert gibt hier den Sauerstoffgehalt der Probe bei 100 %-Sättigung, also die Sauerstoffkapazität wieder. Von dem Punkt C der Ordinate wurde dann eine Gerade zu dem rechtsseitigen Ende des unteren Kurvenschenkels (B) gezogen. Durch Parallelen zu dieser Geraden konnte die Kurve in so viele Abschnitte, wie gewünscht, unterteilt werden. Zu den so gewonnenen Kurvenpunkten (in Abb. 5 ist nur M als Kurvenpunkt bei Halbsättigung eingezeichnet) kann dann der den Sättigungsprozenten des Hämoglobins entsprechende Sauerstoffdruck sowie der zugehörige pH-Wert auf den simultan geschriebenen pH-Kurven abgelesen werden.

Die PO_2 -Werte wurden nach Severinghaus (72) auf einen pH-Wert von 7,4 korrigiert durch Berechnung nach folgender Formel:
$$\log PO_2 \text{ (korrigiert)} = \log PO_2 \text{ (unkorrigiert)} + 0,48 \text{ (pH-Kurve - 7,4)}.$$
 So konnten aus den Kurven die Sauerstoffdrucke zu beliebigen Sättigungsprozenten des Hämoglobins unter Standardbedingungen erhalten werden.

5. Statistik

Aus den Ergebnissen aller Versuche einer Serie wurden die Mittelwerte ($\bar{x}$) und deren Standardabweichungen (s_x) errechnet. Die statistische Interpretation der Ergebnisse erfolgte mit dem Student-t-Test aus unpaaren Beobachtungen. Als Maß für die statistische Signifikanz wurde eine Zufallswahrscheinlichkeit von 1 % angesehen.

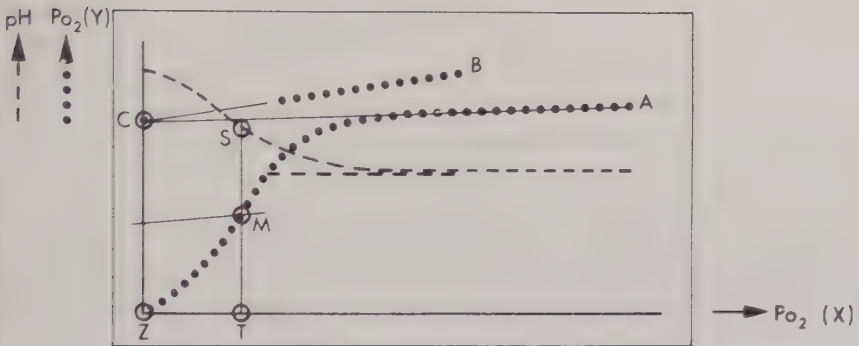


Abb. 5: Schema der Analyse einer mit dem Dissoziationskurven-Analysator gewonnenen Sauerstoffbindungskurve

ERGEBNISSE

=====

Abb. 6 zeigt eine Originalregistrierung der Sauerstoffbindungskurve einer Probe von Rattenblut einschließlich der pH-Wiedergabe mit dem Dissoziationskurvenanalyser Radiometer Kopenhagen. Die Abszisse stellt die Zunahme des Sauerstoffpartialdruckes in der Blutphase, die Ordinate die Abnahme des O_2 -Partialdruckes in der Gasphase des Apparates dar. Der Anfangsteil der Kurve gibt die Sauerstoffbindung bis zu einem PO_2 des Blutes von 125 mmHg wieder, der Endteil zeigt den Verlauf von einem O_2 -Partialdruck von 125 mmHg bis zu 500 mmHg in der Blutprobe. Die Registrierung des Endteils der Kurve erfolgte nach Empfindlichkeitsverstellung der X-Kanal-Schreibung auf 1/5 der Empfindlichkeit der Schreibung des Anfangsteils. Die hier dargestellte Originalregistrierung gibt den Kurvenverlauf bis zu einem Blut- PO_2 von ca. 475 mmHg wieder, wo eine annähernde Linearität des Bindungskurvenverlaufs bereits erreicht ist. Die Ordinate zeigt die Abnahme der Sauerstoffspannung in der Gaskammer durch die Diffusion von O_2 in die desoxygenierte Blutprobe, wobei das Volumen in der Gasphase durch dosierten Argonzufluß konstant gehalten wurde. Der Ausgangssauerstoffdruck in der Gasphase wurde nach vollständiger Äquilibration der Kammer mit einem Gasgemisch von 96 Vol% O_2 und 4 Vol% CO_2 vor Beginn der Kurvenregistrierung unter Berücksichtigung des Wasserdampfdruckes und des Barometerdruckes auf dem Schreiber eingestellt.

Die Bindungskurve insgesamt zeigt den typischen sigmoidalen Verlauf. Die beiden abfallenden Kurven stellen die im Verlauf der Hämoglobin- O_2 -Aufsättigung auf dem Y_2 -Kanal kontinuierlich registrierten pH-Änderungen der Blutprobe entsprechend der H^+ -Ionen Freisetzung bei der Oxygenation des Hämoglobinmoleküls dar.

Abb. 7 zeigt die Umzeichnung einer Originalregistrierung der O_2 -Bindungskurve einer Probe von Rattenblut. Auf der Ordinate wurden hierbei die Sättigungsprozente des Hämoglobins eingetragen, wobei durch Rückverfolgung des linearen Abschnittes des oberen Anteils der Kurve auf die Y-Achse der 100 %-Sättigungswert festgelegt worden war. Durch weitere Schritte in der Auswertung der Kurve (s.o.) lassen sich die O_2 -Partialdrucke zu beliebigen Sättigungsprozenten des Hämoglobins bestimmen.

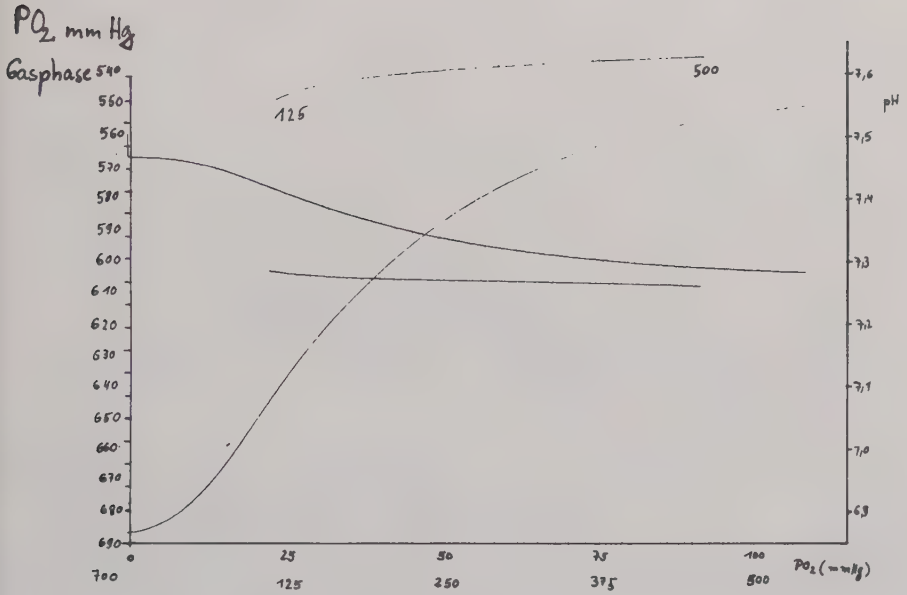


Abb. 6: Photo einer Originalregistrierung der Sauerstoffbindungskurve einer Probe von Rattenblut einschließlich der Blut-pH-Wiedergabe mit dem Dissoziationskurven-Analysator DCA I

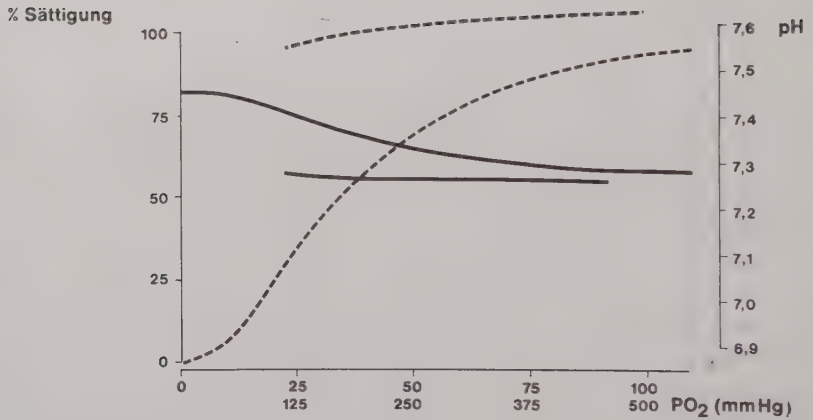


Abb. 7: Umzeichnung einer Originalregistrierung der O_2 -Bindungskurve einer Probe von Rattenblut, wobei hier zur Verdeutlichung gegenüber der Originalregistrierung in der Ordinate die Sättigungsprozente des Hämoglobins eingetragen wurden

Tab. 1 zeigt die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Standardabweichungen des Mittelwertes der Sauerstoffpartialdrucke der 44 Einzelwerte für die Sättigungsprozente 5, 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90 und 95 unter Standardbedingungen. Die Mittelwerte der Sauerstoffpartialdrucke wurden aus den 44 Einzelwerten, die für die jeweiligen Sättigungsprozente auf einen pH von 7,4 korrigiert waren, errechnet. Der zur vergleichenden Charakterisierung der Sauerstoffaffinität gebräuchliche P 50 (Sauerstoffpartialdruck des Blutes bei 50 %-Sättigung des Hämoglobins, pH von 7,4 und einer Temperatur von 37°C) betrug $36,24 \pm 0,43$ ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

In Tab. 2a sind die Einzelwerte, die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Standardabweichungen des Mittelwertes der Sauerstoffdrucke der einzelnen Blutproben der 30 Wistarratten nach pH-Korrektur auf 7,4 für 5, 10, 20 und 25 % Sättigung zusammengestellt, in Tab. 2b die entsprechenden Werte der Blutproben von den 14 SPF-Ratten.

In Tab. 3a finden sich die Sauerstoffpartialdrucke des Blutes der Wistarratten bei 30, 40, 50 und 60 %-Sättigung mit den $\bar{x}$, s und $s_{\bar{x}}$ Werten in Tab. 3b die der SPF-Ratten nach pH-Korrektur auf 7,4.

Tab. 4a schließlich zeigt die PO_2 -Drucke bei 70, 75, 80, 90 und 95 %-Sättigung des Wistarrattenblutes einschließlich der $\bar{x}$, s und $s_{\bar{x}}$ Werte, Tab. 4b die PO_2 -Drucke bei o.g.Sättigungsprozenten für das Blut des SPF-Ratten, beides nach pH-Korrektur.

Im Student-T-Test für unpaare Reihen konnte für beide Versuchsgruppen die Nullhypothese nicht abgelehnt werden. Die beobachteten Unterschiede zwischen den Stichprobenmittelwerten waren somit zufallsbedingt und nicht Hinweis für ein abweichendes Verhalten der O_2 -Bindungskurve bei den beiden Rattenkollektiven. Zur Aufstellung der Durchschnittsauerstoffbindungskurve aus diesen Versuchen konnten somit sämtliche Versuche verwendet werden.

Tab. 1

$\bar{x}$	s	$s\bar{x}$	
9,29	1,26	0,19	p 5
13,80	1,41	0,21	p 10
20,08	1,77	0,26	p 20
22,84	1,97	0,29	p 25
25,47	2,06	0,31	p 30
30,67	2,51	0,37	p 40
36,24	2,87	0,43	p 50
42,57	3,33	0,50	p 60
50,17	4,15	0,62	p 70
54,72	4,41	0,66	p 75
60,12	4,87	0,73	p 80
75,08	5,78	0,87	p 90
86,22	6,64	1,00	p 95

Tab. 2 a

p 5	p 10	p 20	p 25	
11,8	15,0	19,1	21,1	1
10,5	14,4	19,4	21,9	2
9,0	13,6	19,6	22,4	3
10,0	14,6	21,8	24,4	4
8,9	13,9	20,9	23,9	5
9,0	14,1	20,9	23,8	6
10,6	15,5	22,4	25,4	7
10,9	14,5	20,2	23,2	8
9,8	14,6	21,0	24,1	9
8,7	14,0	21,9	25,0	10
6,9	11,0	17,3	19,9	11
9,7	14,7	21,4	24,1	12
6,4	10,5	16,1	18,3	13
8,4	12,5	18,4	21,5	14
8,7	13,6	20,5	23,3	15
7,6	11,3	16,4	18,8	16
7,7	12,0	18,0	20,3	17
8,5	12,4	17,8	20,1	18
9,3	15,3	23,4	26,6	19
9,9	15,1	21,7	24,8	20
9,0	13,0	19,3	21,9	21
8,4	12,7	18,1	20,2	22
9,0	13,2	19,4	21,9	23
8,8	13,4	19,2	21,9	24
10,3	15,2	22,0	24,8	25
9,5	14,2	20,4	22,9	26
9,7	13,7	19,3	21,7	27
10,6	15,5	21,6	24,2	28
10,7	15,3	21,3	24,0	29
9,7	14,3	20,8	23,8	30
9,26	13,77	19,98	22,67	$\bar{x}$
1,19	1,35	1,80	2,03	s
0,21	0,24	0,33	0,37	s $\bar{x}$

Tab. 2 b

p 5	p 10	p 20	p 25	
9,7	12,6	18,9	22,0	1
7,8	13,1	19,5	22,4	2
9,1	13,2	19,6	22,7	3
8,7	13,5	19,2	21,8	4
8,8	14,6	21,9	25,0	5
9,8	12,9	19,9	22,7	6
8,0	13,2	19,3	22,0	7
9,0	12,9	18,2	20,6	8
9,1	14,7	22,2	25,5	9
9,6	15,9	22,9	26,1	10
10,2	14,3	20,9	23,9	11
9,3	12,8	19,3	22,3	12
8,0	12,5	18,6	21,5	13
13,7	18,2	23,9	26,5	14
9,34	13,88	20,30	23,21	$\bar{x}$
1,44	1,57	1,75	1,85	s
0,38	0,42	0,46	0,49	s $\bar{x}$

Tab. 3 a

p 30	p 40	p 50	p 60	
23,2	26,7	32,4	37,0	1
24,5	28,9	34,1	39,6	2
25,2	30,4	35,5	41,0	3
27,5	33,5	39,2	46,8	4
26,6	31,8	37,9	43,7	5
26,4	31,8	37,4	43,8	6
28,5	34,3	40,0	46,5	7
25,1	30,4	35,9	42,4	8
27,0	33,1	39,3	46,6	9
28,2	34,4	41,4	49,5	10
22,7	28,1	33,7	40,1	11
26,8	32,2	37,8	43,9	12
21,3	26,1	31,3	37,7	13
24,5	30,5	36,7	44,0	14
26,0	32,1	38,0	44,9	15
21,3	26,1	31,0	37,5	16
22,9	28,3	33,3	39,2	17
22,5	26,7	32,0	37,8	18
28,6	33,1	38,7	45,7	19
27,7	34,2	40,9	47,2	20
24,7	29,9	35,6	41,8	21
22,5	26,5	31,2	36,0	22
24,2	29,0	33,9	39,9	23
24,5	29,0	33,6	38,9	24
27,7	32,7	37,9	43,6	25
25,7	30,5	35,5	41,1	26
24,0	28,9	33,8	39,5	27
26,5	31,2	36,3	42,3	28
26,2	31,3	36,5	42,6	29
26,7	32,9	39,1	46,0	30
25,30	30,48	35,99	42,22	$\bar{x}$
2,10	2,56	2,96	3,51	s
0,38	0,46	0,54	0,64	s $\bar{x}$

Tab. 3 b

p 30	p 40	p 50	p 60	
24,6	30,1	36,4	43,2	1
25,5	31,3	37,5	44,6	2
25,7	31,1	36,6	43,0	3
23,5	27,7	32,6	38,5	4
27,8	32,7	38,1	44,5	5
25,3	30,7	36,0	42,4	6
24,7	29,6	35,2	42,2	7
22,9	27,3	32,6	38,9	8
28,6	35,0	41,7	49,3	9
28,9	34,8	40,5	46,8	10
26,4	31,7	37,8	44,8	11
25,0	30,2	35,3	41,1	12
24,0	28,7	34,9	41,1	13
29,0	34,2	39,7	46,2	14
25,85	31,07	36,77	43,32	$\bar{x}$
2,01	2,44	2,68	2,99	s
0,53	0,65	0,71	0,79	s $\bar{x}$

Tab. 4 a

p 70	p 75	p 80	p 90	p 95	
44,2	48,6	53,2	67,7	78,6	1
46,1	50,3	55,0	68,9	80,4	2
47,8	52,7	57,4	70,5	80,1	3
55,0	59,5	64,9	79,2	90,5	4
51,0	55,6	60,7	74,9	86,6	5
52,0	56,7	62,2	79,9	92,6	6
54,3	58,4	64,3	78,4	89,0	7
49,8	54,7	60,0	76,7	89,9	8
54,6	59,3	65,1	80,3	92,4	9
62,6	68,9	76,6	91,8	96,7	10
47,6	52,4	57,6	73,5	86,1	11
51,9	55,8	61,4	77,2	89,0	12
45,3	49,5	54,9	69,8	81,9	13
52,5	57,7	63,4	80,4	93,5	14
53,1	58,1	63,9	80,9	96,0	15
45,6	50,5	56,1	72,9	87,5	16
46,4	50,9	56,2	72,6	86,6	17
43,3	48,5	52,7	65,7	75,4	18
54,8	59,0	64,3	80,3	94,1	19
55,0	59,5	64,9	79,6	90,7	20
49,5	53,5	59,2	73,2	82,4	21
42,1	45,8	50,7	60,9	71,3	22
45,9	49,8	54,8	67,5	78,5	23
44,9	49,3	54,6	67,7	71,1	24
50,2	55,1	60,8	74,1	84,3	25
48,8	53,2	57,5	73,2	78,0	26
46,3	50,2	55,3	69,7	80,7	27
49,3	53,4	58,4	72,5	82,8	28
49,1	53,4	58,5	72,2	82,9	29
53,6	58,5	64,1	78,8	89,4	30
49,75	54,29	59,62	74,36	85,30	$\bar{x}$
4,50	4,77	5,26	6,10	6,86	s
0,82	0,87	0,96	1,11	1,25	s $\bar{x}$

Tab. 4 b

p 70	p 75	p 80	p 90	p 95	
51,6	56,8	62,7	79,8	93,8	1
53,4	58,3	64,8	82,8	97,5	2
50,5	54,5	59,5	74,1	84,2	3
46,2	50,3	55,5	70,2	82,0	4
52,8	57,5	63,6	79,3	85,4	5
49,7	54,3	60,0	77,8	89,2	6
49,6	54,1	59,9	73,3	85,4	7
46,0	50,2	54,9	68,5	78,4	8
57,7	62,8	69,0	84,4	95,8	9
54,3	58,9	64,3	80,5	95,0	10
52,7	57,5	62,8	79,2	90,8	11
48,7	53,1	58,4	73,0	83,8	12
48,5	52,7	58,0	71,4	82,7	13
53,4	58,0	63,4	78,6	90,8	14
51,07	55,64	61,20	76,63	88,20	$\bar{x}$
3,24	3,52	3,87	4,86	5,89	s
0,86	0,94	1,03	1,30	1,57	s $\bar{x}$

Abb. 8 gibt die aus den Werten der Tabelle 1 ermittelte Sauerstoffbindungskurve der Ratte unter Standardbedingungen wieder. Sie stellt die Durchschnittskurve aus den 44 Einzelmessungen dar. Die Standardabweichungen ($\pm s$) sind in den Meßpunkten eingezeichnet.

Abb. 9 gibt ein aus den experimentellen Ergebnissen ermitteltes Hill-Plot der Ratte von den Mittelwerten der 44 Einzelmessungen wieder.

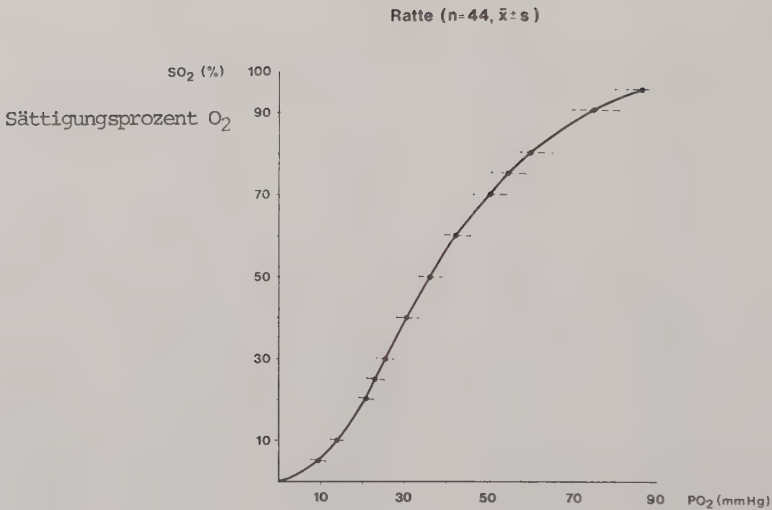


Abb. 8: Sauerstoffbindungskurve der Ratte als Durchschnittskurve von 44 Einzeldarstellungen mit dem DCA I. In den analysierten und errechneten Kurvenpunkten sind die Durchschnittsstandardabweichungen eingetragen ($\pm s$). Die Werte sind Tabelle 1 zu entnehmen.

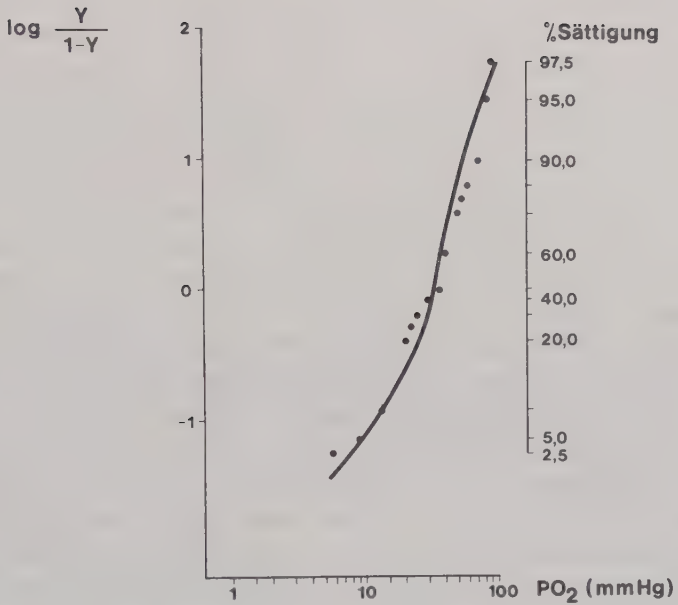


Abb. 9: Hill Plot des Rattenblutes als Mittelwert aus den experimentellen Ergebnissen der 44 Einzelmessungen

DISKUSSION

=====

1. Kritik der Meßmethode

Als eine grundlegende Fehlerquelle der Messungen mit dem DCA I muß die Instabilität der Empfindlichkeit der Sauerstoffelektroden angesehen werden. Diese Fehlerquelle wird auch als die entscheidende bei der Mischungstechnik von Seaton und Lloyd angegeben (69). Bei Verwendung der neueren Sauerstoffelektroden, die entsprechend einer Proportionalität zwischen Elektrodenempfindlichkeit und Kathodendurchmesser einen großen Platin-elektrodendurchmesser aufweisen, wurde von Duvelloy 1970 eine Drift von weniger als 1 % des Anzeigebereiches 24 h nach dem Membranwechsel gefunden, während die Instabilität direkt nach Membranwechsel sich als weit größer erwies (30). Um den durch die Instabilität der O_2 -Elektrodenempfindlichkeit bedingten Fehler möglichst klein zu halten, wurden bei den hier beschriebenen Messungen mit Clark-Elektroden von 25 mm Kathoden und 25 μ m Polypropylenmembranen die Elektrodenmembranen mindestens 24 h vor Gebrauch gewechselt und mit der Elektrodenflüssigkeit in Kontakt gebracht. Bei der Eichung der Sauerstoffelektroden wurde 5-10 min abgewartet, um zu prüfen, ob eine größere Drift vorhanden war. Bei einer großen Instabilität der O_2 -Anzeige bei der Eichung mußte mit einem Membrandefekt, der sich auch durch den "Leakage"-(Dichtigkeits-)Test nachweisen ließ, gerechnet werden. Die Membran wurde dann jeweils erneuert und bis zur nächsten Messung wurde 24 h gewartet. Es muß erwähnt werden, daß durch die Rührung während des Meßvorganges mit einer Umdrehungszahl von 1500 U/min die Benutzung der hochempfindlichen Sauerstoffelektroden erst möglich gemacht wird; denn, wie Laver und Seifen betonen (42), bedingt eine größere Platinoberfläche eine verstärkte Elektrolyse des Sauerstoffs, die in stagnierenden Lösungen die O_2 -Nachdiffusion an die Elektrodenoberfläche übertreffen könnte und zu einer instabilen Anzeige führen würde.

Bei der Wartung der Elektroden mußte darauf geachtet werden, daß keine Verdunstung durch die Elektrodenmembran stattfand; hierzu wurden nach Abschluß der Messungen Aqua dest. in die

Überschußkammer unterhalb der Gasphasenkammer sowie enzymatische Reinigungslösung in die Blutkammer gefüllt. Um eine Kondensation von Wasser am Elektrodenende der Gasphasenelektrode zu verhindern, was zu "Beulen" im Y1-Kurvenverlauf führen würde, war darauf zu achten, daß die Höhe des Wasserspiegels im Thermostatbad nicht unter 1 cm unterhalb des Behälterrandes sank.

Bei unzureichender Empfindlichkeit des pH-Kanals wurde ein Versuch gemacht, die Sensibilität der Glaselektrode zu erhöhen, indem diese zur Reinigung einige Stunden in einer 0,1 molaren HCl-Lösung oder Ammoniumfluoridlösung belassen wurde. Eine weitere Störmöglichkeit war durch im Inneren der Calomelektrode befindliche Luftblasen gegeben, die dann durch mechanische Manipulationen entfernt werden mußten. Außerdem konnte die Durchgängigkeit des Diaphragma an der Spitze der Calomelektrode gestört sein, was durch leichtes Polieren mit trockenem Sandpapier zu beheben war.

Eine andere Fehlermöglichkeit war gegeben in einem Undichtwerden des geschlossenen Systems durch zu lockeren Sitz der oberen Elektrodeneinheit auf der unteren, erkennbar an einem sehr leichten Drehvorgang sowie Deformierungen im Kurvenverlauf. Der unbehinderte Fluß von Argon durch das Ventil der Argonnadel mußte regelmäßig überprüft werden, da anderenfalls ebenfalls Deformierungen der Kurve resultieren würden.

Zu erwähnen sind weiterhin Fehlermöglichkeiten, die bei der Konstruktion des Gerätes berücksichtigt werden mußten und von Duvelloy (30) erläutert werden: Zum sinnvollen Funktionieren des Dissoziationskurvenanalysators ist die Erfüllung der Bedingung der identischen Zeitkonstanten der beiden Kathoden des Meßsystems notwendig. Wenn diese Bedingung nicht erfüllt ist, kommt es zu einer Abweichung der Sauerstoffbindungskurve vom "wahren Verlauf" nach links oder rechts abhängig von der Differenz der Zeitkonstanten der beiden Kathoden. Der Berührungsflächendurchmesser der Gas- und Blutphase muß deshalb so gewählt werden, daß sich bei der Äquilibration von N_2 in der einen und O_2 in der anderen Phase die resultierende Kurve als eine Gerade darstellt, d. h. die Zeitkonstanten der beiden Sensoren gleich sind. Damit die Änderung des Gasphasensauer-

stoffdrucks als adäquates Signal erhalten werden kann, muß ein bestimmtes Verhältnis der Kammervolumina zueinander bestehen, was bei der Konstruktion des DCAI berücksichtigt wurde.

Eine weitere Fehlerquelle stellt der Sauerstoffverbrauch des Blutes selbst dar. Duvelleroy gibt als O_2 -Verbrauch des menschlichen Vollblutes einen Wert von $9,3 \cdot 10^{-5}$ ml O_2 /ml Blut/min an; bei Zugrundelegung der Äquilibrationszeit des DCAI, der Kammervolumina und des Blutvolumens wird von Duvelleroy ein Fehler von weniger als 1 mmHg (Linksverschiebung der Kurve) bei 50 %-Sättigung festgestellt. Möglicherweise ist der Fehler bei dem hier untersuchten Rattenblut etwas größer, wenn man entsprechend der höheren Stoffwechselaktivität der Ratte einen auch höheren Eigenverbrauch des Blutes an O_2 annimmt.

2. Genauigkeit und Bedeutung der Meßmethode im Vergleich zu anderen Methoden

Bellingham und Lenfant stellten bei einem Vergleich der Resultate, die mit dem Dissoziationskurvenanalysator und der Mischungstechnik gewonnen wurden, eine gute Übereinstimmung fest (14): bei den P 50-Werten des Blutes von 21 Personen betrug der mittlere Unterschied zwischen den beiden Methoden 0,45 mmHg, eine Differenz, die keine Signifikanz aufweist. Duvelleroy fand bei seinen Arbeiten mit dem Dissoziationskurvenanalysator ebenfalls keine signifikanten Abweichungen seiner Werte von den Daten durch andere Methoden gewonnener Dissoziationskurven von normalem menschlichem Erwachsenenblut (30). In dieser Arbeit wurden simultane Bestimmungen der O_2 -Bindung des Rattenblutes mit anderen Methoden nicht vorgenommen. Auch war es nicht möglich, Prüfungen der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse durch Doppelbestimmungen zu liefern, da das von einem Tier maximal gewonnene Blut jeweils nur für eine Messung ausreichte (ca. 10 ml) und die Doppelbestimmung mit ein und demselben Blut durch das Hinzukommen unkalkulierbarer Fehler (O_2 -Verbrauch des Blutes selbst, Verschiebung des Blut-pH, mögliche Veränderung des Glycerat-2,3-bisphosphat-Spiegels in vitro durch die zeitliche Verzögerung) nicht sinnvoll gewesen wäre.

Bezüglich der Auswertbarkeit der Dissoziationskurven des Dissoziationskurven-Analysators stellt Duvelleroy (30) heraus, daß von seiner Seite kein Vertrauen in die Werte unterhalb 10 %-Sättigung gelegt würde, da hier ein zu großer Fehler in der O_2 -Ableseung auftreten würde; eine Steigerung der Sensivität in der Y-Achse könnte diesen Fehler verringern, jedoch würde dies zu Schwierigkeiten in der Aufzeichnung der Kurve über den gesamten Bereich wegen eines dann zu großen Formates führen. Es wurden in dieser Arbeit deshalb keine Werte unterhalb 5 %-Sättigung bestimmt. In den oberen Kurvenbereichen scheint bedingt durch die graphische Auswertung eine genaue PO_2 -Ableseung ebenfalls erschwert, was möglicherweise auch zu der in den oberen Kurvenbereichen zu findenden größeren Standardabweichung bei den Durchschnittswerten geführt haben könnte; aus diesen Gründen wurde hier auf Werte oberhalb 95 %-Sättigung verzichtet.

Als Vorteil des Dissoziationskurven-Analysators kann die kontinuierliche Wiedergabe der O_2 -Bindungskurve über den gesamten Bereich in einem Arbeitsgang angesehen werden. Mit einer Mischungstechnik würden im Vergleich zur DCAI-Methode größere Blutmengen benötigt, was im allgemeinen dazu zwingt, das Blut mehrerer Ratten zu poolen. Da die Zeitdauer der Schreibung nur 20-30 Minuten nach der Desoxygenation, die ca. 40-60 Minuten dauert, in Anspruch nimmt, fallen die Ungenauigkeiten durch eine längere Lagerung fort. Bei ihrem Vergleich der Mischungstechnik und Dissoziationskurven-Analysatormethode stellen Belingham und Lenfant fest, daß durch die Schreibung einer kompletten Sauerstoffbindungskurve eine zuverlässigere Bestimmung des n-Wertes der Hill'schen Gleichung als mit anderen Methoden möglich ist. Ebenso sei diese Methode vorzuziehen, wenn die Verlaufsform der Kurve von besonderem Interesse wäre, z. B. beim Vorliegen pathologischer Hämoglobine (14).

Wie schon erwähnt, ist in den oberen und unteren Bereichen der Kurve bei der Bestimmung und Auswertung nach der Dissoziationskurvenanalysatormethode mit größeren Ungenauigkeiten zu rechnen, während die Mischungstechnik gerade in diesen Bereichen genaue Werte liefert. Auch ist es ein Nachteil des DCA, daß zur Bestimmung des Bohreffektes 2 Kurven bei unterschiedlichem

pH-Wert geschrieben werden müssen, während der Bohreffekt mit der Mischungstechnik sehr einfach bestimmt werden kann.

3. Vergleich der eigenen Ergebnisse mit der Literatur

Die folgende Übersicht, die von verschiedenen Autoren mit unterschiedlichen Techniken gewonnenen Halbsättigungsdrucke (P 50) von Rattenblut aus der Literatur:

Autoren	Jahr	Bestimmungsmethode	Rattenstamm	mmHg P 50	n Ratten
Gray, Steadman	1964	Hersch-Analysator	?	38	?
Hall	1966	Van-Slyke-Neill	norweg.Albino- ratte	38+2	?
Gahlen- beck	1968	Van-Slyke	Wistar-AF	35,1+2,3	?
Van Liew	1970	Van-Slyke	Wistar	41	?
Baumann, Bartels	1971	Van-Slyke	Wistar	35,5	15
Turek	1972	Roughton-Scholander	?	34,7+1,8	13
Rakusan	1973	Photometrisch	Sprague-Dawley	35,2+0,5	10
Guy	1974	Photometrisch	Sprague-Dawley	31,0+1,3	10
Bork, Bartels	1975	Photometrisch	Sprague-Dawley	35,1+1,1	30

Bei den hier vorliegenden Messungen wurde mit dem Dissoziations-Kurven-Analysator ein Halbsättigungsdruck von $36,2 \pm 2,87$ mmHg als Mittelwert von insgesamt 44 Ratten (Wistarstamm, wobei 14 Ratten unter SPF-Bedingungen aufgezüchtet waren), gefunden. Unter Berücksichtigung der Streuung der Einzelwerte zeigt sich eine recht gute Übereinstimmung mit den Werten von Gahlenbeck, Baumann, Turek, Rakusan und Bartels, während die Werte von Gray und Hall bedeutend höher, der Wert von Guy bedeutend tiefer liegt. Insgesamt lassen sich also vergleichbare Resultate sowohl zu photometrischen als auch zu tonometrischen Methoden mit dem Dissoziationskurvenanalysator aufstellen.

4. Sauerstoffbindungseigenschaften des Säugetierhämoglobins und Sauerstofftransport

Da die funktionellen Fähigkeiten des Hämoglobins eng mit seiner Struktur verbunden sind, soll bei der Diskussion der Rolle des Hb beim Sauerstofftransport zunächst auf das Hämoglobinmolekül eingegangen werden.

Das Hämoglobinmolekül besteht aus 4 Untereinheiten, von denen jede eine Polypeptidkette enthält. Jeweils zwei der Polypeptidketten haben eine identische Aminosäuresequenz. Im menschlichen Hb A bestehen die beiden sog. alpha-Untereinheiten aus je 141, die beta-Untereinheiten aus je 146 Aminosäureresten. In der alpha-Kette befindet sich in Position 87 alpha, in der beta-Kette in Position 92 beta ein Histidinrest; an jeden der 4 Histidinreste ist eine Hämgruppe gebunden. Die Häm-Gruppe stellt einen Chelatkomplex von Protoporphyrin und einem zwertigen Eisenatom dar, wobei das Eisenatom in dem planen Hämolekül an die Stickstoffatome der 4 Pyrrole gebunden ist. Senkrecht zur Hämebene besteht eine kovalente Bindung der 5. Bindungsstelle des Eisenatoms mit einem Stickstoff des Imidazolringes des erwähnten Histidinrestes der Hämoglobinpolypeptidketten. Die sechste Bindungsstelle des Eisenatoms liegt gegenüber der 5. Bindungsstelle und kann durch verschiedene Atome und Moleküle, insbesondere O_2 , besetzt werden, sog. Liganden. Jede Häm-Gruppe ist in eine durch die Polypeptidkette gebildete hydrophobe Tasche gebettet und die 4 Taschen, die je eine Hämgruppe enthalten, sind an der Oberfläche des Moleküls lokalisiert (62). In Ergänzung der einzigen kovalenten Bindung des Eisenatoms an den Histidinrest der Polypeptidketten bestehen zahlreiche unpolare Bindungen zwischen den Untereinheiten und dem Protoporphyrin (Abb. 10) (82). Der Vergleich der Hämgruppe im Oxy- und Desoxyhämoglobin zeigte, daß im Oxyhämoglobin das Eisenatom in der Prophyrrinringebene lokalisiert ist und dabei einen niedrigen Spinzustand ($S = 0$, Spin = Drehsinn der Elektronen um ihre eigene Achse = Nebenquantenzahl zur Charakterisierung der Elektronenenergie) hat und der Häm-gebundene Histidinrest der Polypeptidketten auf $2 \text{ \AA}$ der Porphyrinebene genähert ist.



Abb. 10: Konformation der alpha- und beta-Untereinheiten mit den Hämgruppen im Oxy-Hämoglobin
(entnommen aus: Hemoglobin, Molecular Biology, cooperative and electronic properties.
Springer Verlag 1974, Weissbluth)

Im Desoxyhämoglobin wird das Eisenatom $0,75 \text{ \AA}$ aus der Prophyrrinringebene heraus in Richtung auf den Histidinrest bewegt und erreicht einen höheren Spinzustand ($S = 2$); außerdem nimmt der Abstand zwischen der Porphyrinebene und dem Histidinrest der Peptidkette zu (39). Die Veränderungen der Hämgruppe bei Oxy- und Desoxygenation sind in den alpha- und beta-Untereinheiten gleich. Die Folgen der Strukturänderung der Hämgruppe auf das Hämoglobinmolekül werden weiter unten besprochen werden.

Wie kaum ein anderes biologisches Makromolekül ist das Hämoglobin in seiner Sekundär- und Tertiärstruktur bis ins Detail erforscht worden; hier ist wieder auf die radiokristallographischen Untersuchungen von Perutz u. a. hinzuweisen (61). Die Sekundärstruktur der Polypeptidketten zeigt neben einem Faltblattbau bis zu 75 % einen Aufbau aus alpha-Helices, die von A bis H nummeriert werden. Die gesamte Polypeptidkette ist in eine komplizierte, aber hochspezifische dreidimensionale Form gefaltet, die annähernd kugelig ist. Die Tertiärstruktur der alpha- und beta-Untereinheiten ist ähnlich, aber nicht identisch: die Mehrheit der Aminosäureseitenketten, die sich in das Innere vorstülpen, sind hydrophob, die polaren Gruppen auf der Gegenseite sind dem Lösungsmittel ausgesetzt. Von Bolton und Perutz wurde gefunden, daß sowohl die alpha- als auch die beta-Ketten in zwei verschiedenen Konformationen erscheinen, die r und t benannt wurden (22). Es zeigte sich, daß die Ketten bei Oxygenation in der r-Konformation vorliegen, also eine Korrelation zwischen Oxygenation des Hb-Moleküls und Tertiärstruktur der Polypeptidketten besteht. Weiterhin wurden Unterschiede in der Tertiärstruktur zwischen den alpha- und beta-Untereinheiten gefunden: Die Häm-Tasche der in der t-Konformation befindlichen alpha-Kette hat Raum genug, um einen Liganden aufzunehmen, während bei der Häm-Tasche der beta-Kette in t-Konformation eine Ligandenbindung nur durch Molekülbewegungen im Bereich der Häm-Gruppe möglich wird.

Die Quaternärstruktur des Hämoglobinmoleküls, die die Beziehung der beiden alpha- und der beiden beta-Ketten untereinander beinhaltet, stellt ein komplexes System dar, das ähnlich für alle Säugetier-Hämoglobine zu sein scheint. Die 4 Unter-

einheiten sind überwiegend durch unpolare Bindungen, in geringerem Umfang durch Salzbindungen und Wasserstoffbrücken zusammengehalten; es existieren keine kovalenten Bindungen zwischen den Untereinheiten. Die Kontakte der alpha- und beta-Untereinheiten untereinander bestehen hauptsächlich aus Salz- und Wasserstoffbrücken, während weit intensiverer Kontakt zwischen alpha- und beta-Untereinheiten über die unpolaren Reste zu finden ist. Diese unpolare Verbindung trägt viel zur Stabilität des Hämoglobinmoleküls bei (52). Im Desoxyhämoglobin bestehen einige Salzbrücken in und zwischen den Untereinheiten, die im Oxyhämoglobin nicht zu finden sind; im Oxyhämoglobin sind die Enden jeder Kette frei, weshalb die Oxy-Konformation auch als R-Form (relaxed) im Gegensatz zu der T-Form (tense) des Desoxy-Hb bezeichnet wird. In der R-Form des Hb-Moleküls liegen auch alle Untereinheiten in der schon erwähnten r-Form vor, entsprechend bei der T-Formation alle Ketten in t-Form. Andere Kombinationen von Tertiärstruktur- und Quaternärstruktur-Konformationen sind möglich.

Die Hauptaufgaben des Hämoglobins sind die Aufnahme des molekularen Sauerstoffs in der Lunge, der Transport zum Gewebe und die Abgabe des Sauerstoffs an die Gewebe entsprechend dem Sauerstoffbedarf. Dies ist möglich, weil die O_2 -Bindung an das Hämoglobin reversibel ist. Durch die Fähigkeit zur kooperativen Sauerstoffbindung, die an die tetramere Struktur des Hämoglobinmoleküls gebunden ist, wird das Hämoglobin zu einem sehr effektiven Transportsystem. Die kooperative Sauerstoffbindung, die sich in einer sigmoidalen Sauerstoffbindungskurve im Gegensatz zu der hyperbolen Bindungskurve z. B. des Myoglobins mit seiner nicht-kooperativen Bindung äußert, beinhaltet, daß die Sauerstoffbindung an eine Hämgruppe durch Interaktionen der Untereinheiten zu einer Steigerung der Sauerstoffaffinität der verbleibenden noch nicht oxygenierten Hämgruppen führt; umgekehrt fördert die Sauerstoffabgabe einer Untereinheit die Sauerstoffabgabe-Bereitschaft der anderen Untereinheiten. In der Lunge mit den hohen alveolären PO_2 wird der Sauerstoff an die Desoxyform des Hb mit seiner niedrigen O_2 -

Affinität gebunden, was zur Überführung von Hb-Bindungsstellen in die Oxyform führt und so durch eine sich steigende Sauerstoffaffinität die weitere Sauerstoffbeladung des Hb begünstigt. Beim Kontakt mit den Geweben spielt sich der Vorgang in umgekehrter Richtung ab. Der extrahierbare Sauerstoffbetrag bei Abfall des PO_2 von dem des arteriellen auf den des venösen Blutes wäre bei monomerer Struktur des Hb nur etwa halb so groß (15). Von Bellingham wird betont, daß dieser große Unterschied in der Verfügbarkeit des Sauerstoffs hauptsächlich bedingt ist durch die bei nicht-kooperativer O_2 -Bindung reduzierte Sauerstoffsättigung bei arteriellen Sauerstoffdrücken, was zu einem reduzierten O_2 -Gehalt des arteriellen Blutes führen würde. Weissbluth betont, daß sowohl das Hämoglobin als auch das Myoglobin bei 80 mmHg voll gesättigt wären, das Myoglobin jedoch bei einem PO_2 von 20 mmHg noch zu 85 % im Gegensatz zum Hb mit 40 % gesättigt sei, daß also bei der monomeren Struktur vor allem die Entsättigung erschwert wäre (82). Bellingham diskutiert, daß die kooperative O_2 -Bindung des Hb bei normaler oder herabgesetzter O_2 -Affinität vorteilhaft wäre, sich bei gesteigerter O_2 -Affinität jedoch nachteilig auswirken würde; Untersuchungen mit abnormen Hämoglobinen mit gesteigerter O_2 -Affinität hätten gezeigt, daß hier die geringere Krümmung der O_2 -Bindungskurve durch die kooperative Bindung die Sauerstoffentladung zu sehr begünstige (15).

Die Sauerstoffbindungskurve zeigt bei der kooperativen Bindung, wie schon beschrieben, den typischen S-förmigen Verlauf im Gegensatz zu einer parabolischen Kurve bei nicht-kooperativer Sauerstoffbindung; der steile mittlere Teil der Kurve, über dessen Bereich sich der Sauerstoffaustausch zwischen Blut und Gewebe vollzieht, liegt bei dem s-förmigen Verlauf bei erheblich höheren O_2 -Drücken als bei einem parabolischen Verlauf, so daß die PO_2 -Druckdifferenz zwischen Kapillarblut und den Gewebszellen relativ groß gehalten wird und entsprechend zu einer Begünstigung der Sauerstoffdiffusion vom Blut ins Gewebe führt.

Ein quantitatives Maß für die Kooperativität liefert der Exponent n in der Hill'schen Gleichung: $\frac{K \cdot p^n}{1 + K \cdot p^n} = Y$, wobei Y = Sauerstoffsättigung, p = Sauerstoffdruck, K = Dissoziationskonstante sind (20). Der Wert von n wurde für normale tetramere

Hämoglobine bei neutralem pH und einer O_2 -Sättigung zwischen 20 und 80 % um 2,8 gefunden im Gegensatz zu einem n-Wert von 1 bei nicht-kooperativer Bindung monomerer Hämoglobine (15).

Es sind zahlreiche Modelle zur Erfassung der Kinetik der kooperativen Sauerstoffbindung des Hb entwickelt worden: 1910 die Hill'sche Theorie, 1912 die Haldane Theorie, 1925 das Adair'sche Modell; in neuerer Zeit entstanden 1965 das allosterische Modell von Monod und 1966 das Modell von Koshland, beide Modelle im Prinzip von thermodynamischen Gesichtspunkten ausgehend. Einen ganz anderen Ansatz machte 1970 und 1972 Perutz mit seinem stereochemischen Modell (63, 64). Bisher soll kein auf alle experimentellen Bedingungen anwendbares Modell existieren.

In der stereochemischen Theorie von Perutz wird die Kooperativität des Hämoglobins durch Konformationsänderungen bei der Oxygenation erklärt. Es wird dabei ein Zusammenspiel der Tertiärstruktur der Untereinheiten und der Quaternärstruktur des gesamten Moleküls angenommen. So soll z. B. die Quaternärstruktur T (tense oder desoxygeniert) einen Zwang auf die Untereinheiten ausüben, in der Konformation t zu bleiben oder in sie überzugehen; das gleiche gilt für die Quaternärstruktur R unter anderen Vorzeichen. Wenn eine der Untereinheiten eine Transformation von der t in die r-Konformation macht, werden die Zwänge, die von der Quaternärstruktur T auf die anderen Untereinheiten ausgeübt werden, gemildert und es wird für die anderen Untereinheiten leichter ebenfalls eine Transformation von t in r einzugehen. Sind die Zwänge der Quaternärstruktur T soweit gelockert, daß das gesamte Molekül die Quaternärstruktur R einnimmt, ändern auch die verbleibenden Untereinheiten ihre Konformation von t zu r. In der stereochemischen Theorie hat die Änderung in der Oxygenation einer Untereinheit (Transformation von t zu r) keinen Einfluß auf die Sauerstoffaffinität der verbleibenden Untereinheiten, wenn sich nicht eine Änderung in der Quaternärstruktur ergibt, d. h. die Kooperativität wird nicht durch Interaktionen zwischen den Untereinheiten, sondern durch Übergang der Quaternärstruktur in eine andere Formation erklärt. Die Oxyformation des tetrameren Hb-Moleküls soll die 100-200fache Sauerstoffaffinität der Desoxyform haben.

Es liegen detaillierte Angaben zu den einzelnen Reaktionsschritten der Konformationsänderung vor: Wenn an eine alpha-Kette, deren Häm-Tasche genug Raum für die Aufnahme von Liganden hat, Sauerstoff gebunden wird, kommt es bei dem den Sauerstoff bindenden Eisenatom zu einer Abnahme des Elektronenhüllenradius, da das Eisenatom in einen niedrigeren Spinzustand versetzt wird und in der Folge bewegt sich das Eisenatom um $0,75 \text{ \AA}$ in die Prophyrinebene hinein (39); die Bindung zwischen dem Eisenatom und dem Stickstoff des Histidinrestes der Helix F wird dabei etwas verkürzt. Diese Vorgänge sind auslösend für eine Reihe von Konformationsänderungen, da das Protoporphyrin mit ca. 60 Atomen der Globinkette in Kontakt steht: die Helix F wird in das Zentrum des Moleküls in Richtung auf die Helix H verschoben. Da in der Desoxyformation der alpha-Untereinheit Helix F und Helix H eine Tasche bilden, die die letzte Thyrosinseitenkette mit den C-terminalen Aminosäureresten der alpha-Kette enthält, wird jetzt durch die Verkleinerung der Tasche das Thyrosin samt den C-terminalen Resten der alpha-Kette aus der Tasche herausgedrängt. Hierdurch werden 2 Salzbrücken, die im Desoxy-Hb vom Argininrest der einen alpha-Kette zu der anderen alpha-Kette bestehen, gebrochen (siehe Abb. 11) (74). Außerdem wird bei diesem Vorgang ein Proton abgegeben. Die alpha-Kette ist von der Konformation t nach r transformiert. Ähnliche Vorgänge spielen sich an den beta-Ketten ab; hier muß jedoch die Hämtasche erst durch die Energie thermischer Vibration für die Aufnahme der Liganden geöffnet werden. Über die Destabilisierung der Desoxyformation kommt es zu einer Quaternärstrukturänderung mit einer erheblichen Zunahme der Sauerstoffaffinität. Lindstrom und Ho fanden, daß die Sauerstoffbindung schrittweise vor sich geht; zuerst sollen die alpha-Untereinheiten reagieren, danach erst die beta-Ketten (46). Die Ligandenbindung der beta-Ketten soll zu einer stärkeren Verformung des Moleküls führen als die der alpha-Ketten (12). Es wurde eine Proportionalität zwischen dem Betrag der Sauerstoffaufnahme und der Zahl der freigesetzten Protonen gefunden, was bedeutet, daß kooperative Bindung und Bohreffekt eng gekoppelt sind.

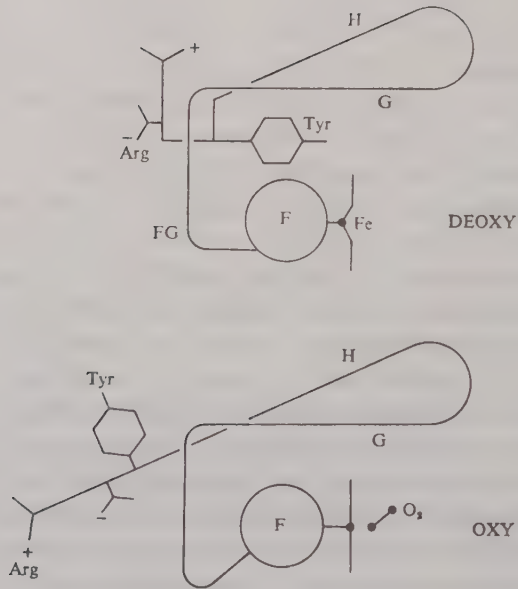


Abb. 11: Änderung der sterischen Struktur der Häm-Tasche einer α -Kette des Hämoglobins bei Oxygenation (entnommen aus: Alfred Beuron Symposium IV 1971, Ten Eyck: Stereochemistry of Hemoglobin)

Der Verlauf der Sauerstoffbindungskurve wird nicht nur durch die kooperative Sauerstoffbindung des Hb-Moleküls bestimmt, sondern ist auch Ausdruck einer bestimmten Sauerstoffaffinität des betreffenden Hämoglobins. Die kooperative Bindungsart bestimmt die Form der Kurve, die Sauerstoffaffinität ist verantwortlich für die Lage der Kurve entlang der Druckachse. Die Sauerstoffaffinität der Hämoglobine variiert unter physiologischen Bedingungen von Spezies zu Spezies, von Individuum zu Individuum und kann außerdem durch Änderungen intra- und extraerythrozytärer Bedingungen geändert werden.

Drei Hauptfaktoren beeinflussen die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins: die Temperatur, der pH-Wert und die intraerythrozytäre Konzentration an organischen Phosphatesteren. Da die O_2 -Bindung durch das Hämoglobin eine exotherme Reaktion darstellt, nimmt die Sauerstoffbindungsfähigkeit mit steigender Temperatur ab, d. h. die Bindungskurve wird nach rechts verschoben. Der Temperaturkoeffizient ($\Delta \log P_{50}/\Delta T$) liegt zwischen 0,019 (27) und 0,024 (5). Der P_{50} gibt den Halbsättigungsdruck bei 37°C und einem pH von 7,4 an und dient als gebräuchliches Vergleichsmaß der Sauerstoffaffinität des Hb. Eine physiologische Bedeutung des Temperatureffektes ist nur bei schwerster Muskelarbeit vorhanden, wo es infolge der Temperatursteigerung in der Muskulatur auf 39°C mit der Herabsetzung der Sauerstoffaffinität des Hb zu einer zusätzlichen Sauerstofffreisetzung von 1-2 Vol% kommen kann (68). Bohr, Hasselbach und Krogh demonstrierten 1904, daß mit steigender CO_2 -Konzentration die O_2 -Affinität des Hb reduziert wird (21). Zunächst wurde dies als reiner Protoneneffekt gedeutet. Später konnte gezeigt werden, daß CO_2 unabhängig von einer pH-Änderung die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins herabsetzt (48). CO_2 wird in Form einer Carbinobindung an die terminalen Aminogruppen der Hämoglobinketten gebunden, wobei eine größere Bindung an das Desoxyhämoglobin besteht. Salhany betont, daß die Reduktion der Ligandenaffinität des Hb durch CO_2 durch eine reduzierte Rate an Ligandenbindungen und nicht durch eine vermehrte Rate der Ligandendissoziation, wie es z.B. bei dem später erwähnten Glycerat-2,3-bisphosphat (DPG) der Fall ist, zustande kommt (67). Der protonenbedingte

wahre Bohreffekt, der unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich durch die Hydratationsreaktion des CO_2 , sog. CO_2 -Bohr-effekt, im Gegensatz zum "fixed acid"-Bohr-effekt, zustandekommt, kann dadurch erklärt werden, daß die Sauerstoffbindung an das Hb mit einer Protonenfreisetzung einhergeht und, umgekehrt, eine Protonenentfernung zu einer größeren Sauerstoffaffinität führen muß. Wie schon oben erwähnt, wird von Perutz die Protonenfreisetzung bei der O_2 -Bindung durch die bei der kooperativen Bindung gesprengten Salzbrücken erklärt. Das Myoglobin mit seiner monomeren Struktur und nicht-kooperativen Bindung hat keinen Bohr-Effekt. 1948 wurde von Wyman die thermodynamische Beziehung zwischen der O_2 -Affinität und der Protonenaktivität auf der einen und der Protonendissoziation und Sauerstoffbindung auf der anderen Seite erfaßt (84): $Y \left(\frac{\log \text{PO}_2}{\text{pH}} \right) = \left(\frac{\Delta H^+}{\Delta Y} \right) \text{PO}_2$; entsprechend ist die Änderung im PO_2 bei gegebener pH-Änderung und konstanter O_2 -Sättigung (Y) der Zahl der von dem Hb bei der Ligandenbindung abgegebenen Protonen numerisch äquivalent; das bedeutet, daß die Freisetzung von Protonen der O_2 -Bindung linear korreliert ist. In verschiedenen Experimenten konnte die Linearität zwischen Protonenfreisetzung und O_2 -Bindung bestätigt werden; in Anwesenheit von CO_2 und 2,3-DPG wurde jedoch eine Nicht-Linearität festgestellt (73). Die Größe des Bohreffektes ($\Delta \log P \text{ } 50 / \Delta \text{ pH}$) liegt bei - 0,48 (72), wenn der Bohreffekt, wie es physiologisch ist, durch P CO_2 -Änderungen hervorgerufen ist, etwas niedriger, wenn er durch Hinzufügen von Protonen hervorgerufen ist. Unter physiologischen Bedingungen hat der Bohreffekt nur in 2 Situationen eine quantitative Bedeutung, nämlich beim diaplazentaren Gasaustausch und bei schwerer Muskelarbeit. In der Plazenta kommt es durch Doppelung des Bohreffektes, indem das mütterliche Blut durch die CO_2 -Abgabe des kindlichen Blutes angesäuert wird und damit eine herabgesetzte O_2 -Affinität bekommt, während das kindliche Blut durch eine Alkalisierung des Blutes eine gesteigerte O_2 -Affinität erwirbt, zu einem quantitativ ins Gewicht fallenden Effekt (7).

1967 wurde von Benesch, Chanutin und Churnish der Einfluß der intraerythrozytären Konzentration von organischen Phosphaten,

insbesondere des Glycerat-2,3-biphosphat (2,3-DPG), auf die O_2 -Affinität des Hb entdeckt (17). In den Erythrozyten des Menschen und vieler Säugetiere ist das 2,3-DPG in hohen Konzentrationen im Vergleich zu anderen Zellen enthalten; diese Anreicherung ist bedingt durch eine für die Erythrozyten spezifisch hohe Aktivität der DPG-Mutase und eine besonders niedrige Aktivität der 2,3-Phosphatase. Die DPG-Mutase katalysiert einen Seitenweg der Glykolyse, die Umwandlung von 1,3-DPG in das 2,3-DPG; die 2,3-DPG-Phosphatase katalysiert den Abbau von 2,3-DPG. Nur ca. 15 % des glykolytischen Abbaus in den Erythrozyten laufen über das 2,3-DPG. Es wurde gefunden, daß das gesamte DPG-Reservoir in den Erythrozyten in 8-12 Stunden erneuert wird (28). Die Syntheserate des 2,3-DPG hängt vor allem von der Konzentration des 1,3-DPG ab, die wiederum abhängig ist von der Geschwindigkeit der Triosephosphatdehydrogenasereaktion mit den Reaktionspartnern GA-3-P, NAD und Orthophosphat sowie der Geschwindigkeit der Phosphoglyceratkinasereaktion mit den Reaktionspartnern ADP, ATP und 3-PG. Als weitere wichtige Regulationsmechanismen der 2,3-DPG-Syntheserate sind die intraerythrozytären pH-Verhältnisse anzusehen: durch eine pH-Verschiebung zum Alkalischen kommt es zu einer Steigerung der DPG-Synthese (4). Dieser Effekt resultiert direkt aus dem pH-Einfluß auf die DPG-Mutase-Aktivität, indirekt aus einer Hebung der 1,3-DPG-Konzentration durch die pH-induzierte Aktivitätszunahme der Glykolyse. Weiterhin hängt die Synthese des 2,3-DPG von seiner Konzentration selbst ab, da es über eine Produkthemmung auf die DPG-Mutase zurückwirkt. Ein Sinken des pH führt zu einer Aktivierung der 2,3-DPG-Phosphatase.

Die Bedeutung des 2,3-DPG für die Sauerstoffbindung des Hb besteht in einer Herabsetzung der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins. DPG wird stark an die Desoxyform des Hb gebunden und so gut wie gar nicht an die Oxyform. Durch Bindung an das Hämoglobinmolekül bedingt das DPG eine Stabilisierung der Desoxyformation, das Hämoglobin wird widerstandsfähiger gegen eine Oxygenation. Die Bindungsstellen des 2,3-DPG sollen zwischen den beiden beta-Untereinheiten liegen, wo DPG am Eingang der zentralen Höhlung gebunden wird; hier sind zahlreiche positive Ladungen lokalisiert, die elektrostatisch mit dem Polyanion DPG interagieren (18). Nur 1 Molekül DPG wird pro Molekül Desoxy-Hb gebunden. Bei besetzten Ligandenbindungen am Häm-Eisen

wird der Raum zwischen den beta-Untereinheiten sehr viel enger, so daß das DPG dann nicht mehr untergebracht werden kann. DPG läßt also die Sauerstofffreisetzung durch das Hb bei höheren Sauerstoffdrücken ablaufen; die kooperative Bindung des O_2 wird jedoch nicht beeinflusst. Perutz betrachtet das Hämoglobin als ein Enzym mit O_2 als Substrat, Häm als Coenzym und H^+ und DPG als allosterische Effektoren.

Es wurde anhand von Untersuchungen mit Erythrozyten ein zweifacher Effekt des DPG festgestellt (11): erstens die spezifische Interaktion des 2,3-DPG mit dem Hb-Molekül, deren maximaler Effekt bei menschlichen Erythrozyten bei einer DPG-Konzentration von 8 $\mu\text{mol/g}$ erreicht ist, zweitens ein unspezifischer Effekt bei höheren Konzentrationen, bedingt durch intraerythrozytäre pH-Änderungen infolge einer Donnan-Umverteilung. Bei dem unspezifischen Effekt der DPG-Ionen führt die Anreicherung der nicht-diffusiblen Phosphatanionen innerhalb der Erythrozyten zu einer Störung des Donnan-Gleichgewichtes, was zu einer regulativen Umverteilung mit Einstrom von H^+ -Ionen führt, also zu einer Abnahme des intrazellulären pH mit einer weiteren Reduktion der O_2 -Affinität des Hb führt entsprechend dem Bohreffekt. Bei physiologischen Konzentrationen des DPG-Astrup und Garby geben die normale Konzentration von DPG in den menschlichen Erythrozyten mit 4 - 5 mmol/l an (6) - sollen 40-50 % des Shiftes der Sauerstoffbindungskurve im Vergleich zur Sauerstoffbindungskurve von DPG-entleerten Erythrozyten durch den Bohreffekt hervorgerufen werden (44).

Die wahrscheinlich wichtigste Rolle des DPG ist die Herabsetzung der O_2 -Affinität des Hämoglobins in der Weise, daß eine ausreichende O_2 -Entladung bei den im jeweiligen Säugetierorganismus herrschenden Bedingungen garantiert ist, d. h., daß die Sauerstoffbindungskurve durch das DPG erst auf die Position gebracht wird, in der sie aktuell unter physiologischen und auch pathophysiologischen Bedingungen gefunden wird; denn adaptative Veränderungen der O_2 -Affinität bei hypoxischen Zuständen oder Störungen des Säurebasenhaushaltes scheinen auch ausschließlich über den DPG-Metabolismus reguliert zu werden.

Die O_2 -Dissoziationskurven von menschlichen Erythrozyten mit unterschiedlichen DPG-Konzentrationen zeigten bei hohen O_2 -Drucken eine vergleichsweise geringe Änderung der O_2 -Sättigung mit steigender DPG-Konzentration; bei geringen O_2 -Drucken fiel die O_2 -Sättigung mit steigender DPG-Konzentration jedoch deutlich ab. Die Häm-Häm-Interaktion, gekennzeichnet durch den Hill-Koeffizienten n , wurde durch einen DPG-Anstieg nicht signifikant verändert. Der Effekt von DPG auf die O_2 -Affinität des Blutes kann daher vollständig durch den P_{50} charakterisiert werden (29).

Unter pathophysiologischen Bedingungen können adaptative und korrektive Änderungen des 2,3-DPG-Metabolismus unterschieden werden, deren Ursache gemeinsam in einer intraerythrozytären pH-Verschiebung zu finden ist. Bei der akuten hypoxischen Hypoxie kommt es infolge des durch die reaktive respiratorische Alkalose angestiegenen Plasma-pH-Wertes zu einer Abnahme des 2,3-DPG-Abbaus sowie einer Zunahme der DPG-Synthese (32). Dieser adaptative Prozeß, der eine verbesserte O_2 -Abgabe des Hb an die Gewebe unter hypoxischen Bedingungen garantiert, wird durch den mit steigender DPG-Konzentration in den Erythrozyten eintretenden Abfall des intraerythrozytären pH-Wertes, bedingt durch die Zunahme der negativen Ladung, autoregulativ gebremst. 1968 beschrieb Lenfant als erster diese adaptativen Veränderungen der Sauerstoffaffinität des Hb bei der Höhenanpassung des Menschen (43). 1970 konnten Gerlach und Duhm, 1971 Baumann ein vergleichsweises Verhalten der O_2 -Bindungskurven bei hypoxischen Ratten beobachten (13). Aus Hypoxieexperimenten mit Ratten fanden Duhm und Gerlach einen maximalen Anstieg des DPG-Spiegels schon einen Tag nach Hypoxieexposition.

Bei chronisch hypoxischer Hypoxie, wie z. B. bei chronischer obstruktiver Bronchitis mit einer konstanten respiratorischen Acidose, fanden Keitt und Hinkes (41) ebenfalls eine deutliche Erhöhung des intraerythrozytären DPG-Spiegels. Hier wird die arterielle Untersättigung als bestimmter Faktor zur DPG-Synthese-Steigerung angesehen. Durch den Anstieg der Desoxyhämoglo-

binkonzentration mit seiner geringeren negativen Ladung kommt es zu einer Neuverteilung der diffusiblen Anionen und Hydrogenionen entsprechend dem Donnan-Gleichgewicht; der so entstandene intraerythrozytäre pH-Anstieg führt dann zu einer Aktivierung der Hexokinase und DPG-Mutase mit konsekutivem Anstieg der DPG-Konzentration. Als weiterer Aktivationsmechanismus der DPG-Synthese in chronischer Hypoxie wird eine Verminderung der Produkthemmung der DPG-Mutase durch Reduzierung des freien DPGs infolge seiner stärkeren Bindung an das vermehrt vorhandene Desoxy-Hb diskutiert.

Lichtman und Kearney fanden bei der Untersuchung des Blutes anämischer Patienten eine Blutalkalose, die mit dem Grad der Hämoglobinreduktion korreliert war; weiterhin wurde eine Erhöhung der DPG-Konzentration in den Erythrozyten gefunden, deren Ausmaß als pH-abhängig erkannt wurde. Unter Berücksichtigung der in vivo Bedingungen kommt es jedoch durch die DPG-Erhöhung nicht zu einer Rechtsverschiebung der Sauerstoffbindungskurve, sondern lediglich zu einer Korrektur der durch die Alkalose bedingten erhöhten Sauerstoffaffinität des Blutes (45).

Von Bellingham und Lenfant wurde die kompensatorische Wirkung der DPG-Konzentrationsänderung in Acidose und Alkalose untersucht (16). Bei akuten Änderungen des Säurebasenhaushaltes zeigen sich in einer ersten Phase keine Änderungen im DPG-Spiegel (ca. 4 Std.); jedoch verändert sich in dieser Phase die Sauerstoffaffinität in bezug auf einen pH von 7,4 bei der Acidose in Richtung einer Abnahme des P_{50} (7,4), bei der Alkalose umgekehrt. Dieser Effekt der ersten Phase wird durch eine Änderung der MCHC (mittlere Hämoglobinkonzentration im Erythrozyten) bewirkt; da mit steigender Hämoglobinkonzentration die Sauerstoffaffinität abnimmt, kommt es bei einer Zunahme der MCHC zu einer Rechtsverschiebung der Sauerstoffbindungskurve, wie es Bellingham und Lenfant bei der Alkalose nachweisen konnten und umgekehrt bei der Acidose. Dieser Mechanismus wirkt gegenregulatorisch auf den direkten pH-Effekt (Bohreffekt) und hält die Sauerstoffbindungskurve auch in den akuten Säure-Basen-Störungen in gewissen Grenzen in vivo unverändert. Halten die Verschiebungen im Säure-Basenhaushalt an, kommt es zu einer zwei-

ten Regulationsphase, die ca. 4-48 Stunden in Anspruch nimmt: bei der Acidose tritt ein durch Enzymhemmung bedingter Abfall der intraerythrozytären DPG-Konzentration ein, das Umgekehrte bei der Alkalose; unter dieser Regulation geschieht im Verlauf dann eine Rückbildung der anfänglich veränderten MCHC und insgesamt eine im Vergleich zu den Verhältnissen vor der Störung unveränderter O_2 -Affinität in vivo.

Abschließend soll die multifaktorielle Beeinflußbarkeit der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins, die immer noch Gegenstand gegenwärtiger Forschungen ist, anhand einer Tabelle auf ihre klinische Bedeutung demonstriert werden (53):

Linksverschiebung

Hypophosphatämie

Transfusion von Blutkonserven

Hämodialyse

Chronischer Antacidaeinnahme

Seltene hämatologische Erkrankungen

Hämoglobinopathien

Hexokinasmangel Anämie

Vermehrung von fetalem Hb

Cyanatbehandlung bei "sickle cell anemia"

Steigerung des CO-Hämoglobins

Zigaretten

Autoabgase

Septischer Schock

Akute Alkalose

Hypothyreose

Rechtsverschiebung

Hyperphosphatämie

"Physiologische Anämie" in der Kindheit

Urämische Anämie

Andere Anämien und Hämoglobinopathien

Herzerkrankungen

Angina pectoris

Myocardinfarkt

Cyanotische Herzerkrankungen

"Low output failure"

Hypoxie

Höhenaufenthalt

chronische Lungenerkrankung

Akute Acidose

Hyperthyreose

Akuter Stress und Muskelarbeit

Die Sauerstoffaffinität des Blutes muß zur Beurteilung ihrer Auswirkungen im Zusammenhang mit den anderen Faktoren, die für die Sauerstoffversorgung des Organismus verantwortlich sind, gesehen werden; dies sind zusätzlich zur O_2 -Sättigung des Hb, die Hämoglobinkonzentration des Blutes, das Herzzeitvolumen und die Gewebsdurchblutung. Entscheidend ist jedoch der resul-

tierende Sauerstoffpartialdruck der Mitochondrien für eine ausreichende O_2 -Versorgung der Zellen. Die Untersuchung dieses Parameters ist jedoch sehr aufwendig; es sollen 2 Methoden zur direkten Bestimmung des Gewebssauerstoffdruckes zur Verfügung stehen: erstens PO_2 -Messung mit Microelektroden (47), zweitens die Bestimmung über den Oxygenationsgrad des Myoglobins des Skelett- und Herzmuskels (24). Ein indirekter Weg zur Beurteilung der Geweboxygenation kann durch Messung des Sauerstoffverbrauchs, des Herzzeitvolumens (HVZ) sowie des PO_2 und O_2 -Gehaltes im arteriellen und venösen Blut und Bestimmung der sog. Sauerstofftransportkapazität, d. i. das Produkt aus dem Sauerstoffgehalt des arteriellen Blutes und HVZ, oder des verfügbaren Sauerstoffs, d. i. die Differenz zwischen Sauerstofftransportkapazität und O_2 -Gehalt des venösen Blutes, eingeschlagen werden.

Bei Untersuchungen der Rolle der Sauerstoffaffinität des Hb im Sauerstofftransport konnte festgestellt werden, daß die Sauerstoffaffinität einer der Faktoren ist, die an der Regulation der Erythropoese beteiligt sind (2). Beim Vergleich der O_2 -Transportgrößen des Menschen und Schafes konnte Parer 1967 die Korrelation von Hb-Konzentration und O_2 -Affinität aufstellen: Schaf und Mensch haben den gleichen O_2 -Verbrauch das gleiche HVZ und die gleiche arterio-venöse- O_2 -Differenz ($AVDO_2$). Die O_2 -Affinität des Schaf-Hb ist jedoch sehr viel geringer, so daß die gleiche $AVDO_2$ bei Mensch und Schaf nur durch die mit der niedrigen O_2 -Affinität korrelierte niedrige O_2 -Kapazität des Schafblutes zustande kommt (60). Auf den Zusammenhang von O_2 -Affinität und Hb-Konzentration des Blutes innerhalb ein und derselben Spezies weisen die Untersuchungen von Bartels (1963) hin, wo postnatal bei Lämmern entsprechend dem Ersatz des fetalen durch das "Erwachsenen"-Hb eine stetige Abnahme der Sauerstoffaffinität in einem Individuum gefunden wurde und die dabei unverändert bleibende $AVDO_2$ sowie der gleichbleibende zentralvenöse PO_2 durch eine Abnahme der O_2 -Kapazität zu erklären waren. Ein Beispiel beim Menschen für diesen Regulationsmechanismus wurde bei Untersuchungen von Personen mit dem Hämoglobin Yakima, das eine besonders hohe O_2 -Affinität hat, dargestellt (55). Auch bei

Trägern von Hb-Yakima sind trotz der hohen O_2 -Affinität zentralvenöser PO_2 und $AVDO_2$ vergleichsweise normal bedingt durch einen starken Anstieg der O_2 -Kapazität des Blutes.

Die Niere als erythropoetinproduzierendes Organ ist für die Rezeption von Änderungen in der O_2 -Affinität besonders geeignet; bedingt durch die niedrige $AVDO_2$ des Nierenblutes liegen die Werte des arteriellen sowie des venösen Blutes im Bereich des oberen Teiles der O_2 -Bindungskurve, wo geringe Änderungen der O_2 -Sättigung zu relativ großen Änderungen im Sauerstoffdruck führen (49). Versmold zeigte, daß unter den Bedingungen einer herabgesetzten O_2 -Affinität und entsprechend erhöhten Gewebs- O_2 -Drucken in der Niere eine Abnahme der erythropoetischen Aktivität der Niere stattfindet (80).

Obwohl die Tatsache einer Veränderung der O_2 -Affinität unter hypoxischen Zuständen und Störungen des Säurebasenhaushaltes hinreichend bekannt ist, sind die tatsächlichen quantitativen Beiträge einer Änderung der O_2 -Affinität über den DPG-Mechanismus für den systemischen O_2 -Transport nicht so eindeutig bekannt, insbesondere weil die Verhältnisse überwiegend in vitro und nicht, wie es erforderlich wäre, in vivo betrachtet wurden.

Hartley fand 1972 (36) bei der Untersuchung des Effektes der O_2 -Affinitätsabnahme bei der Höhenanpassung eine deutliche Herabsetzung der maximalen O_2 -Aufnahme unter Arbeit kurz nach Höhenexposition im Vergleich zu den Verhältnissen auf Meeresspiegel; nach 2 und 10 Tagen - nachdem es zu einer Herabsetzung der O_2 -Affinität des Hb gekommen war - war die maximale O_2 -Aufnahme um ca. 20 % angestiegen, was sich in einer deutlichen Abnahme des O_2 -Gehaltes des zentralvenösen Blutes widerspiegelte und die Herabsetzung der O_2 -Affinität als den Effektor der besseren O_2 -Versorgung beweist.

Oski zeigte durch Untersuchungen an 2 anämischen Patienten unter körperlicher Arbeit, die den gleichen Grad der Anämie aufwiesen, jedoch aufgrund eines hereditären Enzymdefektes eine stark divergierende O_2 -Affinität des Hb aufwiesen, die Bedeutung der O_2 -Affinität unter diesen Bedingungen. Bei dem Patienten mit herabgesetzter O_2 -Affinität kam es zu einem bedeutend stärkeren Abfall der zentralvenösen O_2 -Sättigung, obwohl der Patient mit

höherer O_2 -Affinität einen stärkeren Abfall des zentralvenösen PO_2 aufwies. Zur Kompensation der schlechteren O_2 -Extraktion mußte der Patient mit der hohen O_2 -Affinität mit einer Erhöhung des HZV auf die Arbeitsbelastung antworten (56).

Insgesamt scheint eine direkte Verbesserung der O_2 -Versorgung durch einen Abfall der O_2 -Affinität unter extremen Bedingungen wie Hypoxie und Arbeit nachweisbar;

hier führt die Regulation der O_2 -Affinität zu einer Ökonomisierung der übrigen am O_2 -Transport beteiligten Größen wie z. B. der Auswurfleistung des Herzens. Wie Lichtman und Kearney in ihren Untersuchungen bei der Anämie zeigten, scheint der Nettoeffekt der Rechtsverschiebung der O_2 -Bindungskurve in vitro in vivo lediglich die durch die Anämie bedingte Störung des Säure-Basenhaushaltes zu kompensieren und nicht für einen Ausgleich des Hb-Defizits zu sorgen (45).

5. Vergleichende Atemphysiologie der Säugetiere unter besonderer Berücksichtigung der O_2 -Bindungskurve der Ratte

Die meisten Säugetiere leben in einer Umwelt, die ihnen einen Sauerstoffdruck von 120-150 mmHg O_2 zur Deckung ihres Sauerstoffbedarfs bietet. Der Sauerstoffverbrauch pro kg Körpergewicht als Ausdruck der spezie-spezifischen Stoffwechselaktivität variiert jedoch erheblich. Die Spitzmaus benötigt z. B. 100mal mehr Sauerstoff pro Gramm Körpergewebe als der Elephant. Als grobe Relation gilt eine umgekehrte Proportionalität zwischen Körpergewicht und Stoffwechselintensität pro Gewichtseinheit Körpergewicht. Da eine fast konstante Relation zwischen Körpergewicht und Lungenvolumen besteht, entfällt eine Kompensation des relativen O_2 -Mehrbedarfs der kleinen Tiere durch eine Zunahme des Lungenvolumens. Jedoch steigen die Atem- und Herzfrequenz direkt proportional zur Stoffwechselaktivität des Tieres an. Die Effektivität einer gesteigerten Ventilation bei den kleinen Tieren wird durch eine Verbesserung der Diffusionskapazität bei vergleichbar bleibender Lungenkapazität verstärkt. Ein Anstieg der Sauerstoffkapazität des Blutes ist mit steigen-

der Stoffwechselaktivität nicht zu beobachten; die Ratte weist dem Menschen vergleichbare Hämoglobinkonzentrationen im Blut auf. Neben den hämodynamischen und respiratorischen Unterschieden scheint jedoch die unterschiedliche Sauerstoffaffinität des Blutes der einzelnen Spezies zur Bewältigung der Sauerstoffversorgung des Organismus von Bedeutung zu sein. Die Abb. 12(8) zeigt die Halbsättigungsdrucke des Sauerstoffs für das Hämoglobin verschiedener Säugetiere in Abhängigkeit vom Körpergewicht. Es ist deutlich ersichtlich, daß das Blut der Tiere mit niedrigerem Körpergewicht und höherer Stoffwechselaktivität höhere Sauerstoffdrucke zur Halbsättigung benötigt, d. h. eine verminderte Sauerstoffaffinität besitzt; es besteht eine annähernd lineare Abhängigkeit des P_{50} vom Logarithmus des Körpergewichtes. Die verminderte Sauerstoffaffinität der kleinen Tiere bedingt eine veränderte Position der O_2 -Bindungskurve des Hb, es kommt zu einer Rechtsverschiebung im Vergleich zur O_2 -Bindung mit einem Hb höherer O_2 -Affinität. Für jeden Sauerstoffdruck ist die Sauerstoffsättigung bei Rechtsverschiebung geringer. Das bedeutet, daß der Quotient Δ Sättigung-Hb / ΔPO_2 für eine bestimmte Partialdruckdifferenz größer ist, die Sauerstoffentladung also größer ist. Durch den typischen S-förmigen Verlauf der Sauerstoffbindungskurve ist in dem oberen Bereich der Kurve auch bei herabgesetzter O_2 -Affinität eine Aufsättigung des Hb gewährleistet. In der folgenden Tabelle sind die Halbsättigungsdrucke (P_{50} -Werte) von einigen Säugetierspezies aus der Literatur wiedergegeben:

Tierspezies	p_{50} (mmHg)	Literatur
Maus	52,0	(35)
Löwe	41,7	(57)
Tiger	42,1	(57)
Katze	36,3	(9)
Ratte	35,1	(10)
Schaf	33,7	(9)
Rhesusaffe	32,9	(19)
Rind	30,8	(9)
Kaninchen	30,7	(9)
Schwein	30,6	(9)
Hamster	29,5	(35)
Hund	29,1	(9)
Meerschweinchen	27,3	(9)
Mensch	26,8	(9)
Eichhörnchen	26,8	(56)
Wal	25,2	(25)
Elephant	24,0	(26)
Biber	23,3	(23)

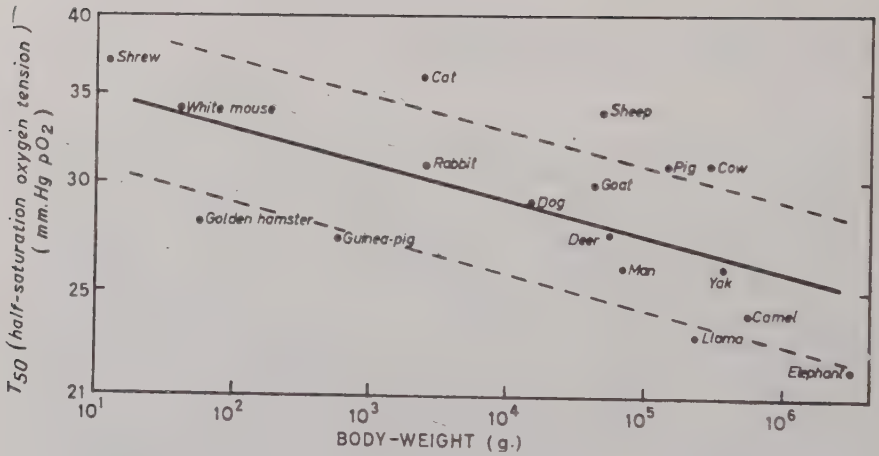


Abb. 12: Diagramm zur Demonstration der Abhängigkeit der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins (Halbsättigungssauerstoffdruck) vom Körpergewicht einer Tierspezies (entnommen aus: Lancet 19 (1964) 599. Bartels, H.: Comparative physiology of oxygen transport in mammals)

Wie man aus der Aufstellung sieht, besteht keine so eindeutige Relation zwischen Sauerstoffaffinität und Körpergewicht. Unterschiedliche Lebensbedingungen, wie z.B. Umgebungs- und Körpertemperatur, die bei den in vivo Verhältnissen eine Rolle spielen, mit den auf Standardbedingungen gebrachten Werten aber nicht erfaßt werden können, mögen hierbei eine Rolle spielen. Auch unterschiedliche Lebensrhythmen, wie z. B. bei winterschlafenden Tieren, mit Stoffwechselumstellung, könnten zur Durchbrechung der sonst bestehenden Korrelation zwischen Körpergewicht und P 50 führen. Sicherlich gehen auch durch unterschiedliche Meßmethoden bedingte Abweichungen ein.

Zur Betrachtung der O₂-Affinität des Hämoglobins verschiedener Säugetiere im Rahmen der vergleichenden Atemphysiologie ist folgende Tabelle (modifiziert nach Parer und Metcalfe (60)) sehr aufschlußreich:

Spezies	Körpergewicht (kg)	O ₂ -Kapazität (Vol%)	p 50 (mmHg)	O ₂ -Verbrauch (ml/kg/min)	HZV (ml/kg/min)	AVDO ₂ (Vol%)	PvO ₂ (mmHg)
Rind	414	13,8	30,8	4,2	105	4,0	40,0
Mensch	75	19,6	26,8	4,1	99	4,1	39,4
Schaf	62	11,4	40,6	4,4	96	4,7	40,6
Hund	10-40	19,6	29,1	4-6	100-120	6,3	36,0
Kaninchen	1,9	16,5	34,0	13,2	218	6,1	38,0
Ratte	0,4	19,6	32,0	18,3	286	6,4	40,0
Eichhörnchen	0,22	19,5	26,8	20,1	313	6,6	34,0

Ein Vergleich der Sauerstofftransportverhältnisse beim Schaf und Menschen bietet sich wegen des gleichen O₂-Verbrauchs bei beiden Spezies an und wurde von Parer und Metcalfe unternommen (60): Die O₂-Kapazität des Blutes vom Schaf ist mit 11 Vol% gegenüber der des Menschen mit 20 Vol% deutlich geringer; die O₂-Affinität des Schafblutes ist mit einem P 50 von 41 mmHg ebenfalls sehr viel geringer als die des Menschen mit einem P 50 von 26,8 mmHg. Auf der anderen Seite bestehen frappierende Ähnlichkeiten in den respiratorischen Größen: die Sauerstoffabgabe und der Sauerstoffbedarf sind fast identisch, das HZV und die AVDO₂ sind identisch und der zentralvenöse PO₂ unterscheidet sich kaum. Beim Schaf wird die niedrige O₂-Kapazität

des Blutes durch die niedrige O_2 -Affinität des Blutes in folgender Weise kompensiert: aus dem Schafblut können 50 % des Sauerstoffs des arteriellen Blutes extrahiert werden, bevor ein zentralvenöser PO_2 von 40 mmHg erreicht ist, beim Menschen dagegen beträgt dieser Wert nur 21 %. Wie aus dem Vergleichspaar Mensch-Schaf ersichtlich, wird es bei erheblich variierenden O_2 -Kapazitäten des Blutes möglich über eine angepaßte O_2 -Affinität des Blutes die notwendige O_2 -Extraktion bei gegebener $AVDO_2$ zu gewährleisten. Ob in diesem Regelkreis jedoch die O_2 -Affinität des Hb oder die O_2 -Kapazität des Blutes die primäre Stellgröße ist, kann in diesem Zusammenhang nicht entschieden werden, denn es ist auch ein Einfluß der O_2 -Affinität des Blutes auf die Erythropoese bekannt.

Abb. 13 (58) zeigt in den gestrichelten Kurven fiktive O_2 -Bindungskurven des Schafes. Kurve I stellt die Verhältnisse dar, die eintreten würden, wenn das Schaf die O_2 -Kapazität des menschlichen Blutes hätte. Unter Zugrundelegung des O_2 -Bedarfs der Gewebe könnte unter diesen Bedingungen des HZV des Schafes von 5,9 l/min auf 3,4 l/min sinken, um den venösen PO_2 auf der physiologischen Höhe zu halten. Würde das HZV nicht in dieser fiktiven Konstellation beim Schaf sinken, würde der zentralvenöse PO_2 auf 55 mmHg steigen. Wenn das Schaf, wie in Kurve II angenommen, die hohe O_2 -Affinität des menschlichen Blutes besäße, würde bei einem physiologischen $AV-PO_2$ -Druckgefälle eine stark verringerte O_2 -Extraktion resultieren. Um die $AVDO_2$ von 4,5 Vol% O_2 beizubehalten, müßte es zu einem Abfall des zentralvenösen PO_2 auf 30 mmHg kommen.

Die Bedeutung der geringen O_2 -Affinität des Blutes der Ratte im Vergleich zu der des Menschen für den systemischen O_2 -Transport der Ratte in Ruhe soll an einem Rechenbeispiel demonstriert werden.

Es wurden dazu die in der obigen Tabelle aufgeführten Daten von Parer und Metcalfe benutzt. Außerdem wurden die Sättigungsprozentage bei den aus der Tabelle entnommenen venösen Sauerstoffdrucken aus eigenen Meßkurven abgelesen. Es wurde ein arterieller PO_2 bei der Ratte von 100 mmHg angenommen und auf den eigenen Meßkurven eine Sättigung von 95 % ermittelt. Zur Errechnung der Sauerstoffextraktion muß der Wert der Sauerstofftransportkapazität des venösen von dem des arteriellen Blutes subtrahiert werden. Unter der O_2 -Transportkapazität versteht

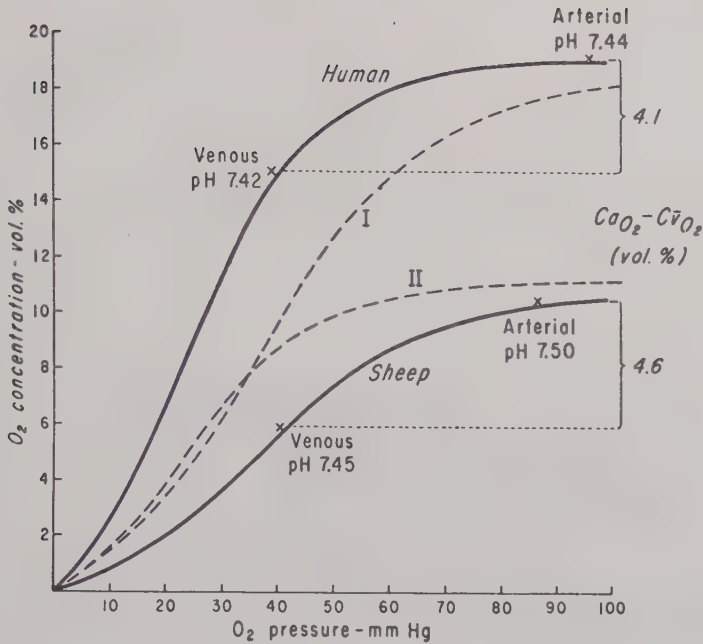


Abb. 13: Sauerstoffbindungskurven und Sauerstoffextraktion von Mensch und Schaf. Kurve I: fiktive O_2 -Bindungskurve des Schafes bei Vorliegen der O_2 -Kapazität des Blutes des Menschen. Kurve II: fiktive O_2 -Bindungskurve des Schafes bei Vorliegen der O_2 -Affinität des menschlichen Hämoglobins. Erläuterungen siehe Text.
(entnommen aus: Resp. Physiol. 2 (1967), Parer, Metcalfe: A quantitative comparison of oxygen transport in sheep and human subjects)

man das Produkt aus dem O₂-Gehalt des arteriellen oder venösen Blutes und dem Herzzeitvolumen. Die arterielle O₂-Transportkapazität gibt also die theoretisch an die Gewebe herantransportierte O₂-Menge/min an, die venöse O₂-Transportkapazität ist ein Maß für die theoretisch pro Minute abtransportierte Sauerstoffmenge. Durch Subtraktion der venösen O₂-Transportkapazität von der des arteriellen Blutes erhält man somit die O₂-Extraktion aus dem Blut. In diesem Rechenbeispiel wurde der Wert der venösen Transportkapazität der Ratte, bei dem statt der venösen Hb-Sättigung der Ratte die des Menschen eingesetzt war, von der arteriellen O₂-Transportkapazität der Ratte subtrahiert. Hierdurch ergab sich die fiktive O₂-Extraktion der Ratte an die Gewebe, wenn die Ratte die O₂-Affinität des menschlichen Hb besäße.

$$O_2\text{-TK (ml/min/kg)} = \text{HZV (ml/min/kg)} \cdot O_2\text{-Kapazität des Blutes (ml O}_2\text{/100 ml)}$$

O₂-Transportkapazität

$$O_2\text{-TK} = \text{HZV (Hb} \cdot 1,37) \cdot (\text{Sätt.}\%(\text{arteriell o. venös}) + PO_2(\text{arteriell o. venös}) \cdot 0,024)$$

Arterielle O₂-Transportkapazität der Ratte:

$$\begin{aligned} O_2\text{-TK} &= 286 \text{ ml/min/kg (19,6 Vol}\% O_2 \cdot 95 \text{ Vol}\% + 0,125 \text{ atm} \cdot 0,024 \text{ ml O}_2\text{/atm)} \\ &= 286 \text{ ml/min/kg (0,196} \cdot 0,95 + 0,003 \text{ ml O}_2) \\ &= 286 \text{ ml/min/kg (0,186} + 0,003) O_2 \\ &= \underline{54,112 \text{ ml O}_2\text{/min/kg}} \end{aligned}$$

Venöse Transportkapazität der Ratte:

$$\begin{aligned} O_2\text{-TK} &= 286 \text{ ml/min/kg (19,6 Vol}\% O_2 \cdot 55 \text{ Vol}\% O_2 + 0,053 \text{ atm} \cdot 0,024 \text{ ml O}_2\text{/atm)} \\ &= 286 \text{ ml/min/kg (0,196} \cdot 0,55 + 0,00127) \\ &= 286 \text{ ml/min/kg} \cdot 0,109 \\ &= \underline{31,174 \text{ ml O}_2\text{/min/kg}} \\ &\quad 54,112 \\ &- \underline{31,174} \\ &\quad 22,938 \text{ ml O}_2\text{/min/kg (Sauerstoffextraktion der Ratte)} \end{aligned}$$

Venöse O₂-Transportkapazität der Ratte mit der Annahme einer 73 %-Sättigung des venösen Blutes (Mensch) = fiktive venöse O₂-Transportkapazität der Ratte mit O₂-Affinität des Menschen:

$$\begin{aligned} O_2\text{-TK} &= 286 \text{ (ml/min/kg) (19,6 Vol}\% O_2 \cdot 73 \text{ Vol}\% O_2 + 0,053 \text{ atm} \cdot 0,0024 O_2\text{/atm)} \\ &= 286 \text{ (ml/min/kg) (0,196} \cdot 0,73 + 0,00127) \\ &= 286 \text{ (ml/min/kg) (0,1430} + 0,0012) \\ &= 286 \text{ (ml/min/kg)} \cdot 0,1442 \\ &= \underline{41,241 \text{ ml O}_2\text{/min/kg}} \end{aligned}$$

$$\begin{array}{r} 54,112 \\ - 41,241 \\ \hline 12,781 \end{array} \text{ O}_2/\text{min/kg} \text{ O}_2\text{-Extraktion der Ratte, wenn sie die} \\ \text{O}_2\text{-Affinität des menschlichen Blutes} \\ \text{hätte.}$$

Die Sauerstoffabgabe bei der Ratte wäre also nach obigem Rechenbeispiel um ca. 10 ml O₂/min/kg vermindert, wenn die Ratte die O₂-Affinität des menschlichen Hb besäße. Müßte die Ratte auf der Sauerstoffbindungskurve des Menschen eine Kompensation des O₂-Defizits vornehmen, wäre dies z. B. durch eine verstärkte Extraktion möglich, die bei den O₂-Affinitätsverhältnissen jedoch zu einer Abnahme des venösen PO₂ und damit des Gewebs-PO₂ mit einer schlechteren O₂-Versorgung der Gewebe führen würde. Bei dem O₂-Verbrauch der Ratte von 18,3 ml O₂/min/kg werden nach dem vorliegenden Rechenbeispiel ca. 50 % des O₂-Verbrauches der Ratte in Ruhe durch die im Vergleich zum Menschen reduzierte O₂-Affinität des Hb bewerkstelligt. Die Ratte hat einen ca. 5fach höheren O₂-Verbrauch im Vergleich zum Menschen pro kg KG. Ratte und Mensch haben eine etwa gleich große O₂-Kapazität des Blutes. Am Mehrbedarf der Ratte an O₂ im Vergleich zum Menschen sind also nach dem obigen Rechenbeispiel zur Kompensation HZV und verringerte O₂-Affinität zu gleichen Anteilen beteiligt.

Unter physiologischen Bedingungen ist es der Ratte also möglich, mit einer größeren Sauerstoffausschöpfung (AVDO₂) im Vergleich zum Menschen ihre Sauerstoffversorgung zu bewerkstelligen. Die geringe Sauerstoffaffinität erscheint für die Deckung eines großen Sauerstoffbedarfs bei hoher Stoffwechselrate erforderlich und günstig zu sein. Turek und Kreuzer untersuchten die Bedeutung der O₂-Affinität des Hb für die Adaptation an hypoxische Bedingungen, wobei menschliches Blut (hohe O₂-Affinität) und Rattenblut (niedrige O₂-Affinität) verglichen wurden (77). Die Autoren gehen davon aus, daß eine Rechtsverschiebung der Sauerstoffbindungskurve sich für die O₂-Extraktion nur dann günstig auswirkt, wenn eine maximal mögliche arterielle O₂-Sättigung bei gegebenem arteriellem PO₂ erreicht wird und die notwendige O₂-Extraktion (AVDO₂) bei einer venösen O₂-Sättigung endet, die einem höchst möglichen venösen PO₂ entspricht. Da

eine adaptative Rechtsverschiebung der DC (Dissoziationskurve) die arterielle O_2 -Sättigung vermindern kann und entsprechend die venöse O_2 -Sättigung bei gleichbleibender O_2 -Extraktion sinkt, besteht die Gefahr, daß auch der venöse Sauerstoffdruck, dessen Höhe entscheidend für die Gewebsoxygenation ist, soweit sinkt, daß Nachteile für die Sauerstoffversorgung der Gewebe entstehen können. Bei ihren Untersuchungen der DC der Ratte und des Menschen in geringer und schwerer Hypoxie verwandten Turek und Kreuzer die sog. physiologische DC als Hauptkriterium. Die physiologische DC stellt eine Gerade zwischen den arteriellen und venösen Punkten auf der Sauerstoffbindungskurve dar. Ein günstiger Effekt nach einer Rechtsverschiebung mit einer steileren Steigung dieser Geraden ist identisch mit einem höheren zentralvenösen PO_2 . Es zeigte sich, daß die Steigung der sog. physiologischen DC der Ratte bei milder Hypoxie steiler, bei schwerer Hypoxie weniger steil im Vergleich zur Original-DC verläuft, also bei einem niedrigeren zentralvenösen PO_2 endet. Das bedeutet, daß die geringere O_2 -Affinität des Rattenblutes im Vergleich zum Menschenblut für den Sauerstofftransport bei milder Hypoxie vorteilhaft, bei schwerer Hypoxie jedoch von Nachteil ist. Insgesamt stellen Turek und Kreuzer fest, daß die Situation der Ratte mit der niedrigen O_2 -Affinität des Hb als Ausgangsbedingung eine ungünstigere Adaptationsfähigkeit im Vergleich zum Menschen an hypoxische Zustände hat. Bei einer O_2 -Kapazität des Blutes von 20 ml O_2 /100 ml Blut und einer $AVDO_2$ von 5 ml O_2 /100 ml Blut liegt der kritische arterielle Sauerstoffdruck für die Ratte bei 47,8 mmHg beim Menschen erst bei 35,1 mmHg, also ist der Umschlagpunkt unter Hypoxie zur schlechteren O_2 -Gewebsversorgung beim Menschen erst später erreicht als bei der Ratte.

Zu Ergebnissen in der gleichen Richtung kamen Baumann und Bartels bei der Untersuchung der Dissoziationskurve der Ratte und des Meerschweinchens in akuter und chronischer Hypoxie (13). Beim Meerschweinchen mit seinem relativ niedrigen P_{50} von 26,9 mmHg im Vergleich zur Ratte mit einem P_{50} von 35,5 mmHg kam es durch die Rechtsverschiebung der O_2 -Bindungskurve unter

Hypoxie in 4000 m Höhe zu einem 27 %-Anstieg der O_2 -Extraktion bei den akut hypoxischen Tieren verbunden mit einem späteren Anstieg der O_2 -Kapazität des Blutes der chronisch hypoxischen Tiere. Bei den Ratten dagegen konnte durch die weitere Rechtsverschiebung der Dissoziationskurve in der akuten Hypoxie kein Anstieg der O_2 -Extraktion erreicht werden. Abb. 14 zeigt graphisch die Verhältnisse bei der Ratte aus derselben Arbeit. Es kommt bei der akuten Hypoxie zu einer leichten Abnahme der O_2 -Extraktion im Rahmen der Rechtsverschiebung der O_2 -Bindungskurve der Ratte; der einzige effektive Adaptationsmechanismus bei der Ratte ist unter o.g. Bedingungen die Steigerung der O_2 -Kapazität des Blutes in der chronischen Hypoxie (siehe Abb. 14).

Woodson und Wranne untersuchten den Einfluß einer künstlichen Linksverschiebung der O_2 -Bindungskurve bei der Ratte durch in vitro und in vivo vorgenommene Entleerung der inraerythrozytären DPG-Speicher (83). Es zeigte sich, daß durch eine Linksverschiebung der DC mit einem Abfall des P 50 von 36 auf 23 mmHg der zentralvenöse PO_2 auf ca. 12 mmHg in Ruhe abfiel. Die Arbeitsfähigkeit der Ratten in einer Tretmühle wurde durch die Linksverschiebung um 10 % reduziert, was vergleichbar war mit der Reduktion der Arbeitsfähigkeit der Tiere durch eine Abnahme der Hb-Konzentration um 10 %. Wahrscheinlich war es bei der Arbeit zu einer deutlichen Rechtsverschiebung der DC in vivo gekommen und außerdem sind der Abfall des Gewebs-pH und der Anstieg der Körpertemperatur bei Arbeit als die O_2 -Entladung begünstigende Faktoren vorhanden, jedoch zeigt der Abfall des venösen PO_2 schon in Ruhe eine ungünstige Wirkung der Linksverschiebung der DC der Ratte an.

Rakusan fand eine Erhöhung des P 50 der Ratte von 35,2 auf 39,9 mmHg unter einer chronischen sideropenischen Anämie (65). In dieser Arbeit wurden keine Untersuchungen zur Auswirkung dieser Rechtsverschiebung auf die O_2 -Versorgung der Ratte gemacht. Nach den Ergebnissen von Turek und Kreuzer (77) müßte diese weitere Abnahme der O_2 -Affinität durch die Anämie bei der Ratte einen ungünstigen Effekt auf die Sauerstoffversorgung der Gewebe haben und hämodynamischen Kompensationen erfordern. Da jedoch in vivo bei einer Anämie eine Blutalkalose vorliegt, die

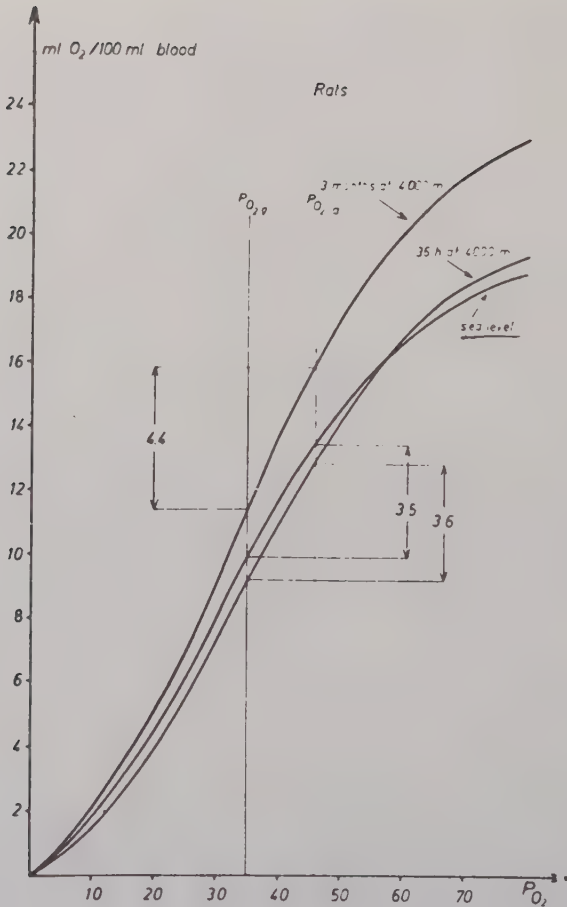


Abb. 14: Sauerstoffbindungskurve der Ratte auf Meeresspiegel und nach Höhenexposition (akut und chronisch)
(entnommen aus Resp. Physiol 11, 1971, Baumann, Bartels: Influence of chronic and acute hypoxia on the oxygen affinity of blood and red cell 2,3-diphospho-glycerate of rats and guinea pigs)

eine Linksverschiebung der Dissoziationskurve bedingt, scheint dieser Mechanismus, der, wie Lichtman (45) in seiner Arbeit über den DPG-Mechanismus bei der Anämie nachwies, nicht über die Kompensation der Blutalkalose hinausgeht, in vivo nur einen ausgleichenden Effekt zu haben.

Vom praktischen Standpunkt aus wären bei Verwendung von Ratten als Versuchstier unter Berücksichtigung der speziellen Sauerstoffbindung vielleicht folgende Punkte zu beachten:

1. Bei einer Anästhesie der Ratte unter Spontanatmung wird es wegen der physiologischen Rechtsverschiebung der DC bei einer narkoseinduzierten Atemdepression schneller zu einer arteriellen Untersättigung kommen als beim Menschen. Es ist daher ratsam bei Versuchen an narkotisierten Ratten zur Vermeidung einer arteriellen Hypoxie ein sauerstoffreiches Gemisch zur Spontanatmung anzubieten. Entsteht zusätzlich noch durch die Hypoventilation eine respiratorische Acidose, so wird die Rechtsverschiebung der DC weiter verstärkt und u. U. kommt es zu einem Abfall des zentralvenösen PO_2 mit einer schlechteren O_2 -Geweksversorgung.
2. Da sich auch eine Linksverschiebung der DC der Ratte ungünstig auf den O_2 -Transport auswirkt, wäre z. B. bei längeren in vivo Messungen die Körpertemperatur konstant zu halten, um eine Linksverschiebung der DC bei Abkühlung zu vermeiden. Wie gezeigt wurde, sind akute und chronisch hypoxische Zustände bei der Ratte wegen ihrer ungünstigen Adaptationsfähigkeit zu vermeiden, wenn physiologische hämodynamische und respiratorische Daten von Interesse sind.

ZUSAMMENFASSUNG

=====

1. Es wurde die Sauerstoffbindungskurve mit dem Dissoziationskurven-Analysator DCA I bei 44 Ratten bestimmt, deren Blut in Pentobarbitalnarkose entnommen wurde.
2. Es wurde ein mittlerer p_{50} von 36,2 mmHg gefunden.
3. Die Ergebnisse wurden mit Daten aus der Literatur verglichen. Es wurde eine Betrachtung der Sauerstoffbindung des Säugetierhämoglobins und des O_2 -Transports im Säugetierorganismus unter besonderer Berücksichtigung der Verhältnisse bei der Ratte angeschlossen.
4. Nach Erörterung der speziellen Sauerstoffbindung des Ratten-Hb im Vergleich zum Hb anderer Säugetiere kann festgestellt werden, daß bei Versuchen mit Ratten akute und chronisch hypoxische Zustände zu vermeiden sind, wenn physiologische hämodynamische und respiratorische Daten von Interesse sind, da die O_2 -Versorgung des Rattenorganismus durch eine schlechtere Adaptationsfähigkeit der O_2 -Abgabe des Hb bei Verschiebungen der O_2 -Bindungskurve des Ratten-Hb leicht gestört werden kann.

LITERATUR

- (1) Adair, G. S.: The Hemoglobin System. J. biol. Chem. 63, 529-545 (1925).
- (2) Adamson, J. W., Parer, J. T., Stamatoyannopoulos, G.: Erythrozytosis assoziiated with hemoglobin Rainer: Oxygen equilibria and marrow regulation. J. clin. Invest. 48, 1376-86 (1969).
- (3) Allen, D. W., Guthe, K. F., Wyman, J.: Further studies on the oxygen equilibrium of hemoglobin. J. biol. Chem. 393-410 (1950).
- (4) Asakura, T., Sato, Y., Minakami, S., Yoshikawa, H.: pH-dependency of 2-3-diphosphoglycerate in red cells. Clin. chim. Acta 14, 840 (1966).
- (5) Astrup, P., Engel, K., Severinghaus, J. W., Munson, E.: The influence of temperature and PH on the dissoziation curve of oxyhemoglobin of human blood. Scand. J. clin. Lab. Invest. 17, 515-23 (1965).
- (6) Astrup, P., Garby, L., de Verdier, C.-H.: Displacement of the oxyhemoglobin dissoziation curve. Scand. J. clin. Lab. Invest. 22, 171-76 (1968).
- (7) Bartels, H.: Chemical factors affecting oxygen carriage and transfer from maternal to fetal blood. In: Oxygen supply to the human foetus. Oxford: Blackwell 1959.
- (8) Bartels, H.: Comparative physiology of oxygen transport in mammals. Lancet 19, 599 (1964).
- (9) Bartels, H., Harms, H.: O₂-Dissoziationskurven des Blutes von Säugetieren. Pflügers Arch. ges. Physiol. 268, 334-65 (1959).
- (10) Bartels, H., Bork, H. et al.: Atemgas-PH-Nomogramme für das Rattenblut, Anaesthesist 24, 84-90 (1975).
- (11) Battaglia, F. C., Ganghey, H., Makowski, E. L., Mescia, G.: The postnatal changes in oxygen affinity of red cells, a dual role of diphospho-glyceric acid. Amer. J. Physiol. 219, 217-221 (1970).
- (12) Bauer, C., Henry, Y., Banerjee, R.: Bindung of 2,3-diphosphoglycerate to hemoglobin valency hybrids, Nature (New. Biol.) 242, 208-09 (1973).
- (13) Baumann, R., Bauer, Ch., Bartels, H.: Influence of chronic and acute hypoxia on the oxygen affinity of blood and red cell 2,3-diphosphoglycerate of rats and guinea pigs. Resp. Physiol. 11, 135 (1971).

- (14) Bellingham, A. J., Lenfant, C.: Hb-affinity for O₂ by O₂-Hb-dissoziation analyser and mixing technique. *Journal appl. Physiol.* 30, 903-904 (1971).
- (15) Bellingham, A. J.: The physiological significance of the Hill parameter "n". *Scand. J. Haemat.* 9, 552-556 (1972).
- (16) Bellingham, A. J., Ditter, J. C., Lenfant, C.: Regulatory mechanisms of Hemoglobin oxygen affinity in acidosis and alkalosis. *J. clin. Invest.* 50, 700-706 (1971).
- (17) Benesch, R., Benesch, R. E.: The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 26, 162 (1967).
- (18) Benesch, R., Benesch, R. E., Enoke, Y.: The interaction of hemoglobin and its subunits with 2,3-diphosphoglycerate. *Proc. nat. Acad. Sci (Wash.)* 59, 1102 (1968).
- (19) Behrman, R. E.: In vivo oxygen dissoziation curves of maternal and fetal rhesus monkeys. *J. of appl. Physiol.* 25, No. 3, 224 (1968).
- (20) Bock, A. V., Field, H., Adair, G. S.: The oxygen and carbon dioxide dissoziation curves of human blood. *J. biol. chem.* 353-378 (1923).
- (21) Bohr, C., Hasselbach, K., Krogh, A.: Über einen in biologischer Beziehung wichtigen Einfluß, den die Kohlensäurespannung des Blutes auf dessen Sauerstoffbindung übt. *Scand. Arch. Physiol.* 16, 402-12 (1904).
- (22) Bolton, W., Perutz, M. F.: Three dimensional Fourier Synthesis of horse hemoglobin at 2,8 Å resolution. *Nature* 228, 551-52 (1970).
- (23) Clausen, G., Ersland, A.: The respiratory properties of the blood of two diving rodents, the beaver and the water vole. *Resp. Physiol.* 5, 351-59 (1968).
- (24) Coburn, R. F., Mayers, L. B.: Myoglobin oxygen tension determined by measurements of carboxymyoglobin in skeletal muscle. *Amer. J. Physiol.* 220, 66-74 (1971).
- (25) Dhindsa, D. S., Metcalfe, J., Hoversland, A. S., Hartmann, R. A.: Comparative studies of the respiratory properties of mammalian blood. *Resp. Physiol.* 20, 93-103 (1974).
- (26) Dhindsa, D. S., Sedwick, C. J., Metcalfe, J.: Comparative studies of the respiratory properties of mammalian blood. *Resp. Physiol.* 14, 332-42 (1972).
- (27) Dill, D. B., Forbes, W. H.: Respiratory and metabolic effects of hypothermia. *Amer. J. Physiol.*, 132, 685-697 (1941).

- (28) Duhm, J., Deuticke, B., Gerlach, E.: Abhängigkeit der 2,3-Diphosphoglycerinsäure-Synthese in Menschen-Erythrozyten von der ADP-Konzentration. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 306, 329 (1969).
- (29) Duhm, J.: The effect of 2,3-DPG and other organic phosphates on the Donnan Equilibrium and the oxygen affinity of human blood. *Proc. of the Alfred Benzon Symposium IV*, 1972, S. 583.
- (30) Duvelleroy, M. A., Buckles, R. G., Rosenkaimer, S., Tung, C., Laver, M. B.: An oxyhemoglobin dissociation analyser. *J. appl. Physiol.* 28, No. 2, 227-333 (1970).
- (31) Gahlenbeck, H., Rathsclag-Schaeffer, A. M., Bartels, H.: Trijodthyronine induced changes of oxygen affinity of blood. *Resp. Physiol.* 6, 16 (1968).
- (32) Gerlach, E., Duhm, J.: 2,3-DPG-metabolism of red cells; regulation and adaptive changes during hypoxia. *Proc. of the Alfred Benzon Symp. IV*, S. 552 (1972).
- (33) Gray, L. H., Steadman, J. H.: Determination of the oxyhemoglobin dissociation curves for mouse and rat blood. *J. Physiol. (Lond.)* 175, 161 (1946).
- (34) Grothe, J.: Die Bestimmung der Sauerstoffbindungskurve von hochverdünnten Hämoglobininlösungen. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 296, 202-211 (1967).
- (35) Hall, F. G.: Minimal utilisable oxygen and oxygen dissociation curve of blood of rodents. *J. appl. Physiol. (Lond.)* 21, 375 (1966).
- (36) Hartley, L. H.: Adjustments of the oxygen transport system during residence at high altitude. In: *Hemoglobin and red cell structure and function*. New York-London: Plenum Press (1972).
- (37) Helen, R. St., Roughton, F. J., Fatt, J.: Polarographic studies of oxygenhemoglobin equilibria at very low saturations. *J. appl. Physiol.* 30, 575-579 (1971).
- (38) Hill, A. V.: Possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curve. *J. Physiol. (London)* 40: iv (1910).
- (39) Hoard, J. L.: Stereochemistry of prphyrins. In: *Hemes and Hemoproteins*, New York-London, Academic Press (1966).
- (40) Koshland, D. E., Nemethy, G., Filner, D.: Comparison of experimental binding data theoretical models in protein containing subunits. *Biochemistry* 5, 365-85 (1965).
- (41) Keitt, A. S., Hinkes, C., Block, A. J.: Comparison of factors regulating red cell 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPC) in acute and chronic hypoxia. *J. Lab. clin. Med.* 84, No. 2, 275-80 (1974).

- (42) Laver, M. B., Seifen, A.: Measurement of blood oxygen tension in anesthesia. *Anesthesiology* 26, No. 1, 73-97 (1965).
- (43) Lenfant, C., Torrance, J., English, E., Finch, C. A., Reynafarje, C., Ramos, J.: Effect of altitude on oxygen binding by hemoglobin and on organic phosphate levels. *J. clin. Invest.* 47, 2652-56 (1968).
- (44) Lenfant, C., Bellingham, A. J.: Physiological factors influencing the hemoglobin affinity for oxygen. Alfred Benzon Symposium IV, Copenhagen S. 736 (1972).
- (45) Lichtman, M. A., Murphy, M. S., Whitbeck, A. A., Kearney, E. A.: Oxygen binding to hemoglobin in subjects with hypoproliferative anaemia, with and without chronic renal diseases: role of PH. *British J. of Hematology* 27, 439 (1974).
- (46) Lindstrom, T. A., Ho, C.: Functionel nonequivalence of alpha and beta hemes in human adult hemoglobin. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash)* 69, 1707-1710 (1972).
- (47) Lübbers, D. W., Luft, U. C., Thews, G., Witzleb, E.: Oxygen transport in blood and tissue. Stuttgart, Thieme (1971).
- (48) Margaria, R., Green, A. A.: The first dissociation constant, PK, of carbonic acid in hemoglobin solutions and its relation of the existence of a combination of hemoglobin with carbon dioxide. *J. biol. chem.* 102, 611-34 (1933).
- (49) Metcalfe, J., Dhindsa, D. S.: The physiological effects of displacements of the oxygen dissociation curve. *Proc. of the Alfred Benzon Symposium IV Munsgard, Copenhagen, S.* 613 (1971).
- (50) Miles, J. E., Robert, J. M.: Mixing technique for the oxygen-hemoglobin equilibrium and Bohr effect. *J. appl. Physiol.* 21, 1898-1902 (1966).
- (51) Monod, J., Wyman, J., Chan, J. P.: On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. molec. Biol.* 12, 88-118 (1965).
- (52) Muirhead, H., Greer, J.: Three dimensional Fourier synthesis of human desoxyhaemoglobin at 3,5 Å resolution. *Nature (Lond.)*, 228, 516-519 (1970).
- (53) Nevins, M. A.: Oxyhemoglobin equilibrium in ischemic heart disease. *JAMA* 229: 804-808 (1974).
- (54) Niesel, W., Thews, G.: Ein neues Verfahren zur schnellen und genauen Aufnahme der Sauerstoffbindungskurve des Blutes und hochkonzentrierter Hämoproteidlösungen. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 273, 380-395 (1961).

- (55) Novy, M. J., Edwards, M. J., Metcalfe, J.: Hemoglobin Yakima: II High blood oxygen affinity associated with compensatory erythrocytosis and normal haemodynamics. J. clin. Invest. 46, 1848-54 (1967).
- (56) Oski, F. A., Marshall, B. E., Cohen, P. J., Sugarman, H. J., Miller, W. W.: Exercise with anaemia. The role of the left-shifted oxygen-hemoglobin equilibrium curve. Ann. intern. Med. 74, 44-76 (1971).
- (57) Otis, A. B., Roughton, F. J. W.: Improved gasometric method for estimating oxygen content and percentage saturation in hemoglobin dissociation curve determinations. Proc. roy. Soc. B London. 144B, 55-67 (1954).
- (58) Parer, J. T., Metcalfe, J.: Oxygen transport by blood in relation to body size. Nature 215, 653 (1967).
- (59) Parer, J. T., Hoversland, A. S., Metcalfe, J.: Comparative studies of the respiratory functions of mammalian blood. IV Young Lion and tiger. Resp. Physiol. 10, 30-37 (1970).
- (60) Parer, J. T., Jones, W. D., Metcalfe, J.: A quantitative comparison of oxygen transport in sheep and human subjects. Resp. Physiol. 2, 196-206 (1967).
- (61) Perutz, M. F., Bolton, W., Diamond, R., Muirhead, H., Watson, H. C.: Structure of hemoglobin. An X-ray examination of reduced horse hemoglobin. Nature (London) 203, 687-690 (1964).
- (62) Perutz, M. F., Muirhead, H., Cox, J. M., Goaman, L. C. G.: Three dimensional Fourier synthesis of horse hemoglobin at 2,8 Å resolution: the atomic model. Nature (London) 219, 131-39 (1968).
- (63) Perutz, M. F.: Stereochemistry of the co-operative effects in hemoglobin. Nature 228, 726-39 (1970).
- (64) Perutz, M. F.: Nature of haem-haem interaction. Nature (London) 237, 495-99 (1972).
- (65) Rakusan, K.: Oxygen affinity of rats during chronic anaemia and after its correction. Resp. Physiol. 17, 263 (1973).
- (66) Roughton, F. J. W., Severinghaus, J. W.: Accurate determination of the O₂-dissociation curve of human blood above 98,7 % saturation with data on O₂ solubility in unmodified human blood from 0 C to 37 C. J. appl. Physiol. 35, 861-869 (1973).
- (67) Salhany, J. M. et al.: Effect of carbon dioxide on human hemoglobin. Journal biol. Chem. 247, 12, 3799-3801 (1972).

- (68) Saltin, B., Gagge, A. P., Stolwijk, J. A. J.: Muscle temperature during submaximal exercise in man. *J. appl. Physiol.* 25, 679-88 (1968).
- (69) Seaton, B., Lloyd, B. B.: A method for obtaining data and equilibrium constants for the hemoglobin-oxygen equilibrium in vitro. *Resp. Physiol.* 20, 191-207 (1974).
- (70) Sherwood-Jones, E., Maegraith, B. G., Sculthorpe, H. H.: Pathological processes in diseases. II Blood of albino rat: approximate physiochemical description. *Ann. trop. Med. Parasit.* 44, 168 (1950).
- (71) Severinghaus, J. W., Weiskopf, R. B., Nishimura, M., Bradley, A. F.: Electrode errors due to polarographic reduction of halothane. *J. appl. Physiol.* S. 640 (1971).
- (72) Severinghaus, J. W.: Blood gas calculator. *J. appl. Physiol.* 21, 1108-1116 (1966).
- (73) Siggard-Anderson, O., Salling, N. et al.: Oxygen-linked hydrogen binding of human hemoglobin. Effects of carbon dioxide and 2,3-diphosphoglycerate III. Comparison of Bohr effect and Haldane effect. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 29, 185 (1972).
- (74) Ten Eyck, F.: Stereochemistry of Hemoglobin. Alfred Benzon Symposium IV, 19-31 (1971).
- (75) Tomita, S., Riggs, A.: Studies of the interaction of 2,3-diphosphoglycerate and carbon dioxide with hemoglobins from mouse, man and elephant. *J. biol. chem.* 246, 3, 547-554 (1970).
- (76) Turek, Z., Ringnald, B. E. M., Hoofd, L. J. C., Kreuzer, A. F.: Cardiac-out-put and mixed venous O₂-saturation and blood O₂-dissociation curve in growing rats adapted to a simulated altitude of 3500 m. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 335, 10 (1972).
- (77) Turek, Z., Kreuzer, F., Hoofd, L. J. C.: Advantage or disadvantage of a decrease of blood oxygen affinity for tissue oxygen supply at hypoxia. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 342, 185-197 (1973).
- (78) Van Liew, H. D.: Preparation of blood-gas diagrams for rats in various acid states. *SAM Techn. Rept.* 70, 136 (1970).
- (79) Van Slyke, D. D. et al.: Methode zur Bestimmung der Gase im Blut durch Vakuumextraktion und Druckmessung. *J. biol. Chem.* 523 (1924).
- (80) Versmold, H., Werner, J., Riegel, K.: Changes of blood oxygen affinity and capacity and red cell 2,3-DPG evoked

by exchange transfusions with ACD preserved blood in newborn infants: their interrelation-ship and influences on oxygen supply of tissues and erythropoesis. Z. Kinderheilk. 113, 1-18 (1972).

- (81) Waldeck, F.: Ein microphotometrisches Verfahren zur Aufnahme der Sauerstoffbindungskurve von einzelnen Erythrozyten. Pflügers Arch. ges. Physiol. 295, 1-14 (1967).
- (82) Weissbluth, M.: Hemoglobin. Molecular Biology, Cooperative and electronic properties. Biochemistry and Biophysics 15, Springer Verlag (1974).
- (83) Woodson, R. D., Wranne, B., Dtter, J. C.: Effect of increased blood oxygen affinity on work performance of rats. J. clin. Invest. 52, No. 10, 2717 (1973).
- (84) Wyman, J. Jr.: Advances in Protein Chem. 4, 407 (1948).

LEBENS LAUF

=====

Geboren 1. Februar 1947 in Berlin.

1966 Abitur an der Schadow-Schule in Berlin-Zehlendorf und Beginn des Medizinstudiums an der Freien Universität Berlin. 1969 Physikum, 1973 medizinisches Staatsexamen Fachrichtung Humanmedizin an der FU-Berlin.

Medizinalassistentenzeit 1973-74: Städt. Krankenhaus Moabit pathologisches Institut, Klinikum Westend innere Abteilung, Städt. Behring-Krankenhaus chirurgische Abteilung, Städt. Auguste-Victoria-Krankenhaus innere Abteilung.

Oktober 1974 Approbation. Seit Februar 1975 als Assistenzärztin auf der Abteilung für Chronisch-Kranke des Städt. Krankenhauses Heckeshorn.

Dissertationsdruck Monath, Bln. 46, Tel. 775 47 77